

Chromatographische Untersuchung der Wechselwirkung von Arzneimitteln und Borclusterverbindungen mit Lipidmembranen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften

-Dr. rer. nat.-

Dem Promotionsausschuss des Fachbereichs 2 (Biologie/Chemie)
Der Universität Bremen vorgelegt von

Ping Fan
Bremen
2012

Tag des öffentlichen Kolloquiums: 26.09.2012

1. Gutachter: Prof. Dr. Detlef Gabel

2. Gutachter: Prof. Dr. Jorg Thöming

Prüfer: Prof. Dr. Dieter Wöhrle, Dr. Stefan Stolte

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Detlef Gabel danke ich sehr für die Überlassung der interessanten, attraktiven und abwechslungsreichen Themen, die stete Diskussionsbereitschaft und seine Betreuung bzw. Unterstützung während meiner Doktorarbeit.

Für die Erstellung des Zweitgutachtens danke ich Herrn Prof. Dr. Jorg Thöming. Für die Übernahme des Prüferamtes bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dieter Wöhrle und Herrn Dr. Stefan Stolte.

Den Mitgliedern und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Detlef Gebel danke ich für die gute Zusammenarbeit, stete Diskussion- und Hilfsbereitschaft.

Bei den Kollegen im UFT, Herrn Dr. Jürgen Arning, Herrn Dr. Stefan Stolte, Frau Jennifer Neumann und Herrn Dr. Chul-Woong Cho usw., bedanke ich mich sehr für die Diskussion, die Hilfe und die Hilfsbereitschaft. Auch möchte ich mich für den Zugang zum HPLC-MS-Gerät bedanken!

Ich bedanke mich bei Herrn Dr. Thomas Dülcks und Frau Dorit Kempken für die Hilfe bei der Lösung der Probleme mit dem HPLC- bzw. MS-Gerät.

Bei Herrn Stephan Griesel möchte ich mich herzlich für das Korrigieren der Grammatikfehler bzw. für den Schliff meiner Dissertation vor Abgabe bedanken.

Ein Dank geht auch an alle, die mir Hilfe und Unterstützung gegeben haben.

Ein besonderer Dank geht an meine Frau Ying Xin, an meine Eltern und an meinen Bruder, sie haben mich während meines Studiums und meiner Dissertation immer unterstützt.

Summary

Immobilized liposome chromatography (ILC), a novel and attractive chromatographic method, was utilized to investigate the interaction of drugs and chemicals with liposomes immobilized in Superdex 200. The specific retention factors k_s of 22 structurally different substances (4-methylbenzylalkylamines, β -blockers, carboxylic acids and non-steroidal anti-inflammatory drugs) were measured using ILC. The correlations of k_s with the retention factors k_{IAM} from immobilized artificial membrane chromatography (IAM) and with the partition coefficients P_{Okt} and D_{Okt} from 1-octanol-water-system were investigated. Linear relationships were found not only between $\log k_s$ and $\log k_{IAM}$ but also between $\log k_s$ and $\log P_{Okt}$ and $\log D_{Okt}$ for structurally related substances, and the linear relationship between $\log k_s$ and $\log k_{IAM}$ was better. The correlations of $\log k_s$ with $\log D_{Lip}$ from liposome-water-system were also investigated for β -blockers and 4-methylbenzylalkylamines, there was a good linear relationship between these two parameters for β -blockers, but for 4-methylbenzylalkylamines there was a bilinear relationship.

The values of k_s or $\log k_s$ could be used to evaluate the interactions of compounds with membranes and the partitioning of the compounds into membranes. In addition, $\log k_s$, for predicting the absorption of drugs, is an important value as well. The absorption of drugs in human body increases, if the $\log k_s$ increases between 0 and 1, whereas if the $\log k_s$ of drugs is between 1 and 3, which means saturation of absorption (Beigi et al. 1995).

ILC was then utilized to investigate the interaction between boron cluster compounds ($B_{12}H_{12}^{2-}$, BSH^{2-} and BNR_3^-) with membranes. However, we found that these cluster compounds could interact strongly with the liposome carrier, Superdex 200, and thus the interaction between the cluster compounds and liposomes was distorted. Therefore, the research was then concentrated on the interaction of the boron cluster compounds ($B_{12}H_{12}^{2-}$, $B_{12}H_{11}Tol^{2-}$, BSH^{2-} , $BSMe^{2-}$, BNR^{3-} , $B_{12}Cl_{12}^{2-}$, $B_{12}Br_{12}^{2-}$ and $B_{12}I_{12}^{2-}$) with several hydrophilic gel materials (Superdex 200, Sepharose 4B, Sephadex G-50, Sephadex G-100, alumina and silica gel) so that a better liposome carrier could be found.

Compared with the weakest interactions between all of the boron cluster compounds with silica gel, Superdex 200 interacted strongly or very strongly with almost all boron cluster compounds. Sepharose 4B, Sephadex G-50, Sephadex G-100 interacted considerably with perhalogenated cluster compounds. Alumina interacted remarkably with not only perhalogenated

clusters but also dodecahydrocluster ($B_{12}H_{12}^{2-}$) and its derivative ($B_{12}H_{11}Tol^{2-}$). The thermodynamic parameters of $B_{12}Cl_{12}^{2-}$, BNH_3^- , $BNMe_3^-$ and $BNEt_3^-$ on Superdex 200 and $B_{12}H_{12}^{2-}$, $B_{12}Cl_{12}^{2-}$, $B_{12}Br_{12}^{2-}$ and $B_{12}I_{12}^{2-}$ on Sephadex G-100 were explored. The change of enthalpy ΔH° was negative for the both gel materials, the change of entropy ΔS° was also negative. The change of enthalpy ΔH° was compensated to a large extent by ΔS° .

Based on the weak interaction of silica gel with boron clusters, the idea of silica gel as liposome carrier or supporter was followed. First of all, liposomes from egg PC were bound covalently on silica gel in order to create a novel system (K-EPC) that could be utilized to investigate the interaction between boron cluster compounds and membranes.

From the retention time on K-EPC it was concluded that hydrophobic interactions played an important role for the retention of the cluster compounds; carbon side chains, which were bound either directly to cluster or to sulfur or nitrogen, could prolong the retentions remarkably. Another conclusion was that perhalogenated clusters interacted very well with the head groups of liposomes and could distribute into lipid bilayer, probably they could diffuse into the core of liposomes as well. The bigger the halogen atom, the stronger is this tendency. The retentions of drugs and chemicals on K-EPC showed that the more hydrophobic substances could be retained longer.

For the further studies it was then tried to bind different fragments (namely $-(CH_2)_3PO_4(CH_2)_2N(CH_3)_3$, $-PO_4(CH_2)_2N(CH_3)_3$, $-(CH_2)_3O(CH_2)_6PO_4(CH_2)_2N(CH_3)_3$ and $-O(CH_2)_6PO_4(CH_2)_2N(CH_3)_3$) of Phosphatidylcholine covalently onto silica gel, in order to understand the interactions of boron cluster compounds with membranes more in detail. From the results of measurements with such column materials it was known that the electrostatic effect played also a role and contributed to the whole interaction. However, the results were also somewhat remarkable because the log_k-values from $Si-(CH_2)_3PO_4(CH_2)_2N(CH_3)_3$ and $Si-(CH_2)_3O(CH_2)_6PO_4(CH_2)_2N(CH_3)_3$ were smaller than those from $Si-PO_4(CH_2)_2N(CH_3)_3$. It contradicted the results from measurements with K-EPC. Probably this is due to the smaller density of choline head groups, which were attached on silica gel, in comparison to the density of Phosphatidylcholine in the membrane. Apart from that, the stability of column materials was one point, which should be improved.

Biomimetic chromatography and a new chromatographic stationary phase with non-covalent phospholipid coating on silica gel, were also investigated. However, these chromatographic methods could not give satisfying results.

Inhaltverhältnis

1. Einleitung	1
2. Liposom, Biomembran und Phospholipid	4
2.1 Liposom	4
2.1.1 Herstellung von Liposomen	5
2.2 Biomembran	5
2.3 Phospholipid	8
3. Verteilungskoeffizient	10
3.1 Verteilungskoeffizient aus dem 1-Oktanol-Wasser-System	10
3.1.1 Bestimmung der Verteilungskoeffizienten mit Potentiometrie	10
3.1.2 Shake-Flask-Methode zur Bestimmung von Verteilungskoeffizienten	11
3.1.3 Nachteile des 1-Oktanol-Wasser-Systems	12
3.2 Verteilungskoeffizient aus Liposomen-Wasser-System	12
3.2.1 Messung der Verteilung im Liposomen-Wasser-System	13
3.2.1.1 Potentiometrie	13
3.2.1.2 Gleichgewichtsdialyse	13
3.2.1.3 Beschränkung des Liposomen-Wasser-Systems	14
4. Chromatographische Methoden zur Untersuchung der Wechselwirkung	15
4.1 Immobilisierte-Artifizielle-Membran Chromatographie (IAM)	15
4.1.1 Einleitung	15
4.1.2 Strukturvergleich von Zellmembran, Liposom und IAM	15
4.1.3 Kapazitätsfaktor k_{IAM}	16
4.1.4 Nomenklatur	17
4.1.5 Dichte des Lipids	21
4.1.6 Anwendung	21
4.1.7 Stabilität der IAM-Phase	21
4.2 Immobilisierte-Liposomen-Chromatographie (ILC)	22
4.2.1 Einleitung	22
4.2.2 Anwendungen	23
4.2.3 Immobilisierung von Liposomen	23
4.2.3.1 Sterische Immobilisierung	23
4.2.3.1.1 Immobilisierung durch Dialyse von Detergens-Lipid-Lösung in Gegenwart von einer Gelmatrix	24
4.2.3.1.2 Immobilisierung durch Mischung von Liposomensuspension mit Gelmatrizen	24
4.2.3.2 Immobilisierung durch hydrophobe Wechselwirkungen	26
4.2.3.3 Avidin-Biotin-Immobilisierung	27
4.2.3.4 Immobilisierung durch kovalente Bindungen zwischen Trägern und Liposomen	27
4.2.3.4.1 Immobilisierung durch Disulfidbindungen	28
4.2.3.4.2 Immobilisierung von Liposomen durch deren kovalente Verknüpfung mit aktivierten Gelmaterialien	29

4.2.3.4.3 Immobilisierung von Liposomen durch deren kovalente Bindung an Chloroformat aktiviertem Silicagel.....	29
4.2.4 Spezifischer Kapazitätsfaktor k_s	29
4.2.4.1 Spezifischer Kapazitätsfaktor unter Berücksichtigung von Wechselwirkungen mit einer Gelmatrix.....	30
4.2.4.2 Spezifischer Kapazitätsfaktor ohne Berücksichtigung von Wechselwirkungen mit einer Gelmatrix.....	30
4.2.5 Einfluss der Zusammensetzung des Liposoms auf die Retention.....	30
4.2.6 Einfluss von Flussrate, Gelvolumen und Lipidmenge auf Retention und k_s	31
4.2.7 Einfluss von Ionenstärke des Eluents, die Größe des Ions im Eluent, pH des Eluents und Lamellarität der Liposomen auf Retention und k_s	31
4.2.8 Stabilität der immobilisierten Liposomen.....	33
4.2.9 $\log k_s$ eines Arzneimittels bzw. dessen Absorption in menschlichem Körper.....	33
4.2.10 Korrelation zwischen $\log k_s$ -Wert und $\log k_{IAM}$, $\log D_{Lip}$, $\log P_{Okt}$ bzw. $\log D_{Okt}$	34
5.Arzneimittel-Membran-Wechselwirkung gemessen mit ILC, und Vergleichen von $\log k_{ILC}$ mit $\log k_{IAM}$, $\log D_{Lip}$, und $\log P_{Okt}$ bzw. $\log D_{Okt}$.....	35
5.1 ILC-Säule.....	36
5.2 Chromatographisches System und mobile Phase.....	37
5.3 Eigenschaften der untersuchten Substanzen.....	37
5.4 Vergleich der $\log k_{ILC}$ -Werte mit $\log D_{Lip}^{7,0}$ -Werten.....	38
5.5 Vergleich der $\log k_{ILC}$ -Werte mit $\log k_{IAM}^{7,0}$ -Werten.....	40
5.6 Vergleich der $\log k_{ILC}$ -Werte mit $\log P_{Okt}^{7,0}$ bzw. $\log D_{Okt}^{7,0}$ -Werten.....	42
5.7 Wechselwirkungen zwischen chemischen Verbindungen bzw. Arzneimitteln und Superdex 43.....	
6.Untersuchung von Borclusterverbindungen mit ILC.....	49
6.1 Bor-Neutroneneinfangtherapie (Boron Neutron Capture Therapy : BNCT).....	49
6.2 Wechselwirkung zwischen BSH und Liposomen aus Phosphatidylcholin.....	50
6.3 Borclusterverbindungen (Dodecaborat-Cluster-Verbindungen).....	51
6.4 Retention der Borclusterverbindungen gemessen mit ILC.....	53
6.5 Untersuchung des Einflusses von Superdex 200 auf die Retention.....	54
7.Wechselwirkung von Dodecaborat-Cluster-Verbindungen mit hydrophilen Säulenmaterialien.....	58
7.1 Hydrophile Säulenmaterialien.....	58
7.1.1 Superdex.....	58
7.1.2 Sepharose.....	58
7.1.3 Sephadex.....	60
7.2 Vorbereitung von Säulenmatrizen, Säulenpacken und Äquilibration.....	60
7.3 HPLC-System.....	61
7.4 Auswertung.....	62
7.4.1 Retentionsfaktor k	62
7.4.2 Thermodynamik.....	62
7.5 Resultat.....	63
7.5.1 Retention von Borclusterverbindungen an unterschiedlichen Säulenmatrizen.....	63
7.5.2 Enthalpie, Entropie und Gibbs freie Energie der Wechselwirkungen.....	73

7.6 Diskussion.....	81
8. Modifikation von Silicagel	86
8.1 Ein reizvolles Modell: Silicagel mit kovalent gebundenen Liposomen	86
8.1.1 Vorbehandlung des Silicagels	86
8.1.2 Aktivierung des Silicagels mit 4-Nitrophenylchloroformat.....	87
8.1.3 Kovalente Kopplung von Liposomen ans aktivierte Silicagel.....	87
8.2 Modifikation von Silicagel mit unterschiedlichem Anteil des Phosphatidylcholins	87
8.2.1 Kopfgruppe des Phosphatidylcholins mit einem kurzen hydrophoben Schwanz (-CH ₂ CH ₂ CH ₂ -) kovalent an Silicagel gebunden	88
8.2.2 Nur die Kopfgruppe des Phosphatidylcholins kovalent an Silicagel gebunden	90
8.2.3 Kopfgruppe des Phosphatidylcholins zusammen mit -C ₃ H ₆ OC ₆ H ₁₂ - kovalent an Silicagel gebunden	92
8.2.4 Kopfgruppe des Phosphatidylcholins mit einem längeren hydrophoben Schwanz, -C ₆ H ₁₂ -, kovalent an Silicagel gebunden	94
8.2.5 Diskussion über Modifikation.....	95
8.3 Nomenklatur	96
8.4 Hydrolyse des Säulenmaterials und die Stoffmengebestimmung des Phosphats.....	97
8.4.1 Phosphat-Assay	97
8.4.1.1 Laborgeräte und Reagenzien.....	98
8.4.1.2 Durchführung	98
8.4.1.3 Eichkurve aus der Standardlösung	99
8.5 Die untersuchten Substanzen.....	101
8.6 Chromatographische Systeme.....	102
8.7 Untersuchung der verschiedenen mobilen Phase mit Silicagel.....	102
8.8 Ergebnisse der Messungen und Diskussion	106
8.9 Zwischenprodukte bei der Gelherstellung	122
8.10 Stabilität der Säulenmaterialien.....	126
9. Biomimetische Chromatographie.....	128
9.1 Bereitstellung einer biomimetischen chromatographischen Säule	128
9.2 Menge der immobilisierten Phospholipiden.....	128
9.3 Messergebnisse und Diskussion.....	130
10. Silicagel mit einer EPC-Beschichtung	133
11. Zusammenfassung	137
Literatur	139
Abkürzungsverzeichnis.....	152

1. Einleitung

Neue und mehr effiziente Arzneimittel lassen Patienten/Patientinnen profitieren. Es ist immer eine tolle Botschaft für diejenigen, die unter einer gewissen Krankheit leiden, dass ein neu entwickeltes Arzneimittel ihnen helfen kann. Allerdings, es ist überhaupt nicht einfach, ein erfolgreiches Arzneimittel schlußendlich zu erhalten. Es wurden 8000 bis 10000 chemische Verbindungen für den gleichen Zweck getestet, und zwar nach dem primären und sekundären Drogentest, bis ein Arzneimittel für die Behandlung eingesetzt und produziert werden kann. (Yang et al. 1996)

Am häufigsten müssen die Arzneimittel eine oder mehrere Membranen penetrieren, um an die notwendige Stelle zu kommen, und die Aktivität darzustellen. Die Arzneimittel, welche über den Mund verabreicht werden, müssen durch die Verdauungsapparatur in den Dünndarm gelangen, dort müssen sie zuerst durch die Membran des Epithels absorbiert werden. Das Aufnehmen von einem Arzneimittel kann durch unterschiedliche Transporttypen realisiert werden. Das sind Diffusion über die Lipiddoppelschicht von einer Zelle, parazellulärer Transport, Transport mit Hilfe von Transportproteinen und Transzytose (Lundahl et al. 1997). Häufig können nur kleine Moleküle, deren Molekülmassen kleiner als 200 sind, durch parazelluläre Wege transportiert werden. Der Transport eines Arzneimittels über Transportproteine ist auch nicht so üblich, weil ein Transportprotein normalerweise spezifisch ist und nur für eine Art von sehr ähnlichen chemischen Verbindungen effektiv ist. Daher können die meisten Arzneimittel nur durch Diffusion die Zellmembran durchqueren.

Die Diffusion eines Arzneimittels über die Zellmembran ist oft von den Eigenschaften der chemischen Verbindung in Arzneimittel abhängig. Eine chemische Verbindung hätte mit der Membran wechselwirken und eventuell in der Membran verteilt werden können, um in der Zelle zu diffundieren. Die Eigenschaften einer chemischen Verbindung bei Molekülgröße, Ladungen, Wasserstoffbrückenbindungen und Lipophilie und so weiter beeinflussen die Wechselwirkungen mit den Lipiddoppelschichten, insbesondere den Kopfgruppen und den hydrophoben Teilen (Kotecha et al. 2007 und Palm et al. 1996 & 1997). Darunter ist die Lipophilie der Verbindung als der wichtigste Parameter für das Vorhersagen und das Interpretieren der Permeabilität zu betrachten (van de Waterbeemd und Testa. 1987, Camenisch et al. 1996 und Conradi et al. 1996).

Da die Lipophilie eines Arzneimittels für den wichtigsten Aspekt zum

Verstehen der Absorption gehalten wurde, wurde sie auch in der Vergangenheit mit einigen Methoden intensiv untersucht. Eine der wichtigsten Methoden liegt daran, die Verteilung einer chemischen Verbindung zwischen einer organischen Phase und einer wässrigen Phase zu bestimmen, damit die Lipophilie eingeschätzt werden kann. Je stärker eine chemische Verbindung mit der organischen Phase wechselwirken kann, desto lipophiler ist diese Verbindung, und desto größer ist das Verteilungsverhältnis. Das am häufigsten verwendete Zweiphasensystem ist ein 1-Oktanol-Wasser-System (Avdeef 1992 und Leo et al. 1971). Eine andere Methode, die die Lipophilie eines Arzneimittels bestimmen kann, ist RP-Chromatographie. Allerdings ist die isotropische organische Phase nicht identisch mit einer Membran, welche zwitterionische Kopfgruppen besitzt und anisotropisch ist. Auch mit HPLC ist der Unterschied zwischen stationärer Phase der RP-18-Säule und der Membran offensichtlich. Die Wechselwirkung von einem Arzneimittel mit 1-Oktanol oder C18-Ketten kann die wirkliche Wechselwirkung von dem Arzneimittel mit Membranen nicht widerspiegeln, besonders wenn das Arzneimittel nicht neutral ist. In der Tat sind 62,9% der Arzneimittel ionisierbar, davon sind 14,5% Säuren, 67,6% Basen und 17,9% Ampholyte von verschiedenen Typen (Kotecha et al. 2007). Die Wechselwirkungen zwischen Membranen und den Arzneimitteln, welche negative oder positive Ladungen oder beides enthalten, können nicht nur hydrophobe, sondern auch elektrostatische Wechselwirkungen einschließen. Von daher ist ein System, welches Ähnlichkeit mit Membran zeigt, notwendig für die Untersuchung der Wechselwirkungen.

Das Liposomen-Wasser-System ist ein solches System. Dieses System stammt aus dem 1-Oktanol-Wasser-System, und die organische 1-Oktanolphase wird durch eine Liposomensuspension ersetzt. Aufgrund der chemischen und strukturellen Ähnlichkeit von Liposomen mit Membranen ist die Liposomensuspension anisotropisch und die Verteilung eines Arzneimittels zwischen Liposomen und Wasser kann die Wechselwirkung des Arzneimittels mit Membranen besser angeben, damit die Absorption auch besser vorhergesagt werden kann. Jedoch, die Messung mit einem Liposomen-Wasser-System ist zeitaufwendig, und außerdem werden relativ viel Probematerialien bzw. Liposomen gebraucht, von daher sind andere, bessere Methoden zu erwarten.

Chromatographische Methoden kommen in Frage und werden entwickelt, weil Chromatographie schnelle und präzise Analyse bieten kann. Die Hauptidee der chromatographischen Methoden besteht darin, dass neue stationäre

Phasen, welche Ähnlichkeiten mit Membranen zeigen, für Säulen-Chromatographie entwickelt werden. Ein Modell ist die Immobilisierte-Artifizielle-Membran Chromatographie (IAM), wobei eine Lipidmonoschicht kovalent mit Silicagel verknüpft wird. Das andere Modell ist Immobilisierte-Liposomen-Chromatographie (ILC), wobei Liposomen durch verschiedene Verfahren an angemessenen Gelmatrizen immobilisiert werden. Was für diese Methoden noch wichtig ist, dass die Retention von einer Substanz nur auf die Wechselwirkungen zwischen der Substanz und Lipidmonoschichten bzw. Liposomen zurückzuführen sein soll und es keine oder nur geringe Wechselwirkungen zwischen der Substanz und Gelmatrizen geben soll.

In dieser Arbeit wurde ILC zur Untersuchung von ausgewählten Arzneimitteln eingesetzt. Die spezifischen Kapazitätsfaktoren der Arzneimittel aus der ILC korrelierten mit den Kapazitätsfaktoren aus IAM, und mit den Verteilungskoeffizienten aus dem 1-Oktanol-Wasser-System bzw. dem Liposomen-Wasser-System. Der Transport und die Absorption eines Arzneimittels können durch dessen spezifischen Kapazitätsfaktor eingeschätzt werden, was häufig dann mit zeitaufwendigen Caco-2-Zelllinien gemacht werden muss (Artursson et al. 1990 and 1996). Die Untersuchungen von Borclusterverbindungen, welche Potenzial für Tumorthapien (Bor-Neutroneneinfangtherapie, BNCT) bzw. andere medizinischen Verwendungen gezeigt haben, wurden auch mit ILC und anderen chromatographischen Methoden durchgeführt. Es wurde versucht, neue chromatographische stationäre Phasen zu entwickeln, um die Wechselwirkung zwischen Borclusterverbindungen und Membranen besser verstehen zu können.

2. Liposom, Biomembran und Phospholipid

2.1 Liposom

Das Liposom ist ein artifizielles Vesikel, worin ein wässriges Medium durch eine Lipid-Doppelschicht völlig verkapselt wird. Das Lipid, welches ein Liposom bildet, ist häufig Phospholipid. Liposomen wurden zuerst von Bangham 1965 beschrieben und von Sessa 1968 zum ersten Mal als Liposom bezeichnet (Sessa und Weissmann, 1968).

Zur Herstellung der Liposomen wird zuerst Phospholipid in ein wässriges Medium gegeben. Weil die Moleküle des Phospholipids nicht in wässrigen Medien löslich sind, richten sie sich auf eine planare Doppelschicht aus, um die ungünstigen Wechselwirkungen zwischen der wässrigen Phase und der langen hydrophoben Kohlenstoffketten der Fettsäure zu vermeiden und minimieren zu können. Geschlossene und gedichtete Vesikel werden dann automatisch aus den planaren Doppelschichten gebildet, weil dadurch die ungünstigen Wechselwirkungen fast komplett eliminiert werden können. (Liposomes, edited by New, R.R.C)

Normalerweise verteilen sich die Liposomen in wässrigen Medien. Sie werden in multilamellare große Vesikel (MLV), kleine unilamellare Vesikel (SUV) und große unilamellare Vesikel (LUV) eingeteilt. (Liposomes as Drug Carriers, edited by Schmidt, K.H.). Multilamellare große Vesikel (MLV) sind aus mehreren konzentrischen Lamellen aufgebaut, und haben eine Größenordnung von 100 nm bis ca. 5000 nm. Die Größenordnung der kleinen unilamellaren Vesikel (SUV) liegt zwischen 20 nm und 50 nm, im Gegensatz dazu beträgt die Größenordnung der großen unilamellaren Vesikel (LUV) 60 nm bis 1000 nm.

Liposomen haben eine geschlossene vesikelförmige Struktur, welche der doppelschichten Struktur von einer Biomembran entspricht, sie werden daher als Modellmembranen verwendet. Außerdem werden Liposomen als Arzneimittelträger verwendet, dabei werden Liposomen mit weiteren Wirkstoffen, wie z.B. Vitamin A, beladen. Liposomen umschließen die Wirkstoffe, schützen sie und erhalten so ihre Wirksamkeit auch über einen längeren Zeitraum.

Bei unterschiedlichen Temperaturen existieren unterschiedliche Phasen der Liposomen. Falls die Temperatur sich erhöht, ändern sich die Liposomen von einer geordneten Phase zu einer ungeordneten Phase, wobei die freie Bewegung der Moleküle sich verstärkt. Es gibt eine Temperatur T_c , wobei der Phasentransfer stattfindet und extra Wärme gebraucht wird, um die weitere Steigerung der Temperatur zu gewährleisten. Die Länge der hydrophoben Kohlenstoffketten und die Ungesättigkeit können zur Änderung der T_c führen.

Der Bestandteil der Liposomen kann ähnlich einer Membran sein, wobei Phospholipide auch die wesentlichen Komponenten sind.

2.1.1 Herstellung von Liposomen

Zuerst soll Phospholipid oder ein Lipidgemisch in Chloroform gelöst werden, bis die Lösung ganz klar ist. Mit Hilfe eines Rotationsverdampfers wird das Lösungsmittel, Chloroform, wieder abgezogen und ein Lipidfilm wird gebildet. Unter Vakuum von ca. 10^{-4} bar soll der Lipidfilm mindestens 12 Stunden getrocknet werden, damit möglichst wenig Lösungsmittel vorhanden ist.

Dann wird ein wässriger Puffer, normalerweise die mobile Phase der Chromatographie, zugegeben. Das gesamte Gemisch wird im Wasserbad bei einer Temperatur von $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 Minuten inkubiert, dazwischen wird stark vortexiert. Wenn die gesamten Lipide in die Flüssigkeit gelangen, ist eine Suspension, die multilamellare Liposomen enthält, fertig. Bei circa $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ wird die multilamellare Liposomensuspension extrudiert. Die Extrusion wird 15 mal gemacht, die Porengröße des Polycarbonatfilms beträgt 100 nm. Nach diesem Schritt kommen unilamellare Liposomen zustande.

2.2 Biomembran

Biomembranen sind die Grenzschichten zwischen Kompartimenten bzw. Organellen, wie z.B. Mitochondrien, Golgi-Apparat, endoplasmatisches Reticulum und Zellkern etc, in einer Zelle und auch zwischen Zellen. Es gibt dementsprechend Mitochondrienmembran, Golgi-Membran, Membran des endoplasmatischen Reticulums, Kernmembran und Plasmamembran.

Biomembran ist die Membran, die aus Membranlipiden und Membranproteinen besteht. Sie hat eine Doppelschichtstruktur, welche eine Dicke von 5 nm bis 8 nm besitzt. Phospholipide sind die wesentlichen

Membranlipide, zudem können Cholesterol und Glycolipide usw. auch die Bestandteile einer Membran sein (Abb. 2.1).

Die Zusammensetzung der in Biomembranen vorhandenen Lipide kann bezogen auf seinen zellulären Verwendungszweck unterschiedlich sein. Die Biomembranen der Organellen unterscheiden sich durch das Vorkommen besonderer Lipidmoleküle. Beispielsweise sind das Cardiolipin (Abb. 2.2) bei den Mitochondrien, die Sterole (Cholesterin (Abb. 2.2)) in den Membranen des endoplasmatischen Reticulums, der Golgi-Vesikel sowie der Plasmamembran. Überdies kann die Komplexizität der Lipidmuster dadurch gesteigert werden, dass die Fettsäurereste in den einzelnen Lipiden variieren.

Durch ihre Lipiddoppelschicht (hydrophoben Anteil) sind Biomembranen eine nichtwässrige Barriere zwischen zwei wässrigen Kompartimenten, sodass das Durchqueren fast aller polaren Molekülen und anorganischen Ionen stark eingeschränkt ist. Für kleine hydrophile Substanzen wie H_2O oder O_2 sind Biomembranen jedoch durchlässig, z.B. Na^+ und K^+ durchqueren eine

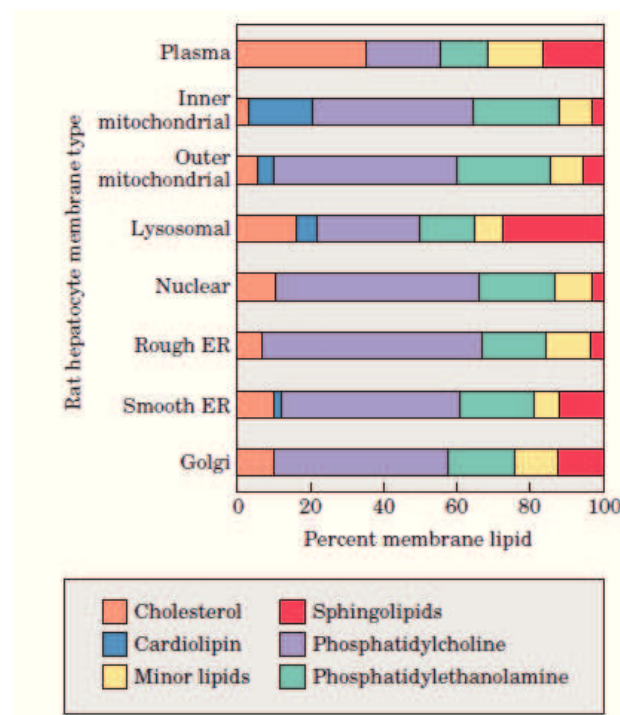


Abb. 2.1 Lipidkomposition der Plasmamembran und Organellmembran einer roten Hepatozyte (Lehninger Principles of Biochemistry, Edited by Nelson, D.L. and Cox, M.M.)

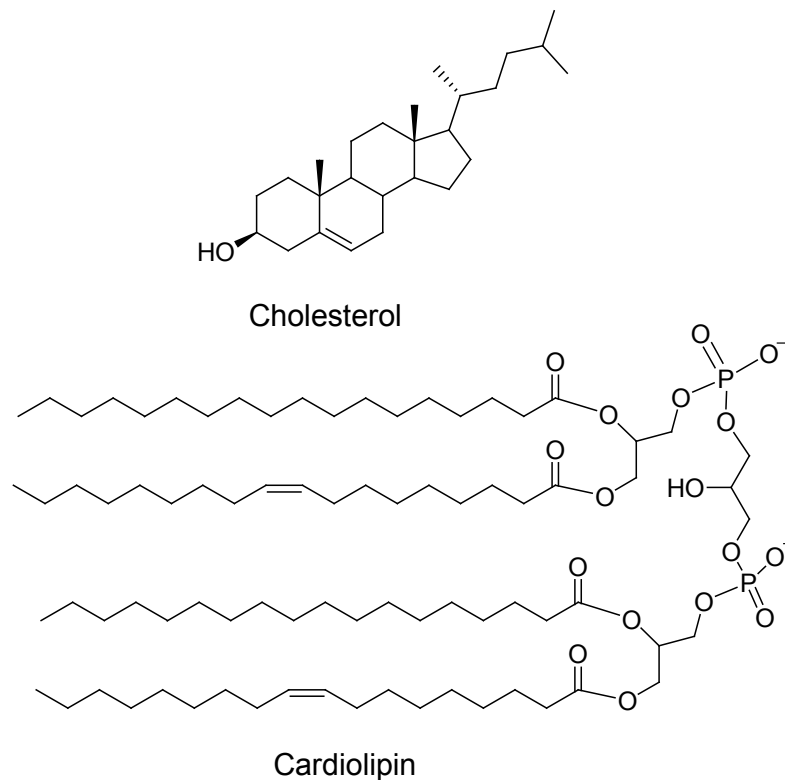


Abb. 2.2 Strukturformel von Cholesterol und Cardiolipin
(1',3'-di-O-(3-sn-Phosphstidyl)-sn-Glycerol)

Membran 10^9 mal so langsam wie ein Wassermolekül eine Membran durchquert (Brechner et al. Kompaktlexikon der Biologie). Diese Eigenschaft von Biomembranen wird als Semipermeabilität bezeichnet und ist die Grundlage für die sämtlichen osmotischen Vorgänge. Allerdings sind jedoch Transportprozesse von Metaboliten und Ionen durch Membranen im Zellstoffwechsel notwendig. Die Transportprozesse können mit Hilfe von Proteinen durchgeführt werden. Proteine dienen als Pumpe, Kanal, Transporter, Rezeptor und Energietransducer, und können peripher oder integral mit Membranen assoziieren. Die in Biomembranen enthaltenen Transportproteine und Kanalproteine helfen aber dem Transport von einer bestimmten Art von Substanzen. Die meisten Substanzen müssen aber in der Lage sein, mit Membranen zu wechselwirken, sich in den Membranen zu verteilen um durch die Membranen diffundieren zu können.

Dass Biomembranen strukturell und funktionell unsymmetrisch sind, ist eine weitere wichtige Eigenschaft, die sich aus der Kompartimentierungsregel ableiten lässt. Die äußeren und inneren Flächen der biologischen Membran haben unterschiedliche Komponenten und enzymatische Aktivität. Membranen können nicht im Cytoplasma einer Zelle neu entstehen, sondern verändern

Größe bzw. Umfang durch Abschnürungen und Fusionsprozesse (z.B. Endocytose, Exocytose, Syncytien). Bestandteile der Biomembranen werden bei Prokaryoten in der Plasmamembran und bei Eukaryoten in der Membran des endoplasmatischen Reticulums synthetisiert. Bestimmte Membranproteine können bezogen auf den Membranfluss durch Erzeugung von Vesikeln und deren Fusion mit bereits bestehenden Membranstrukturen an ihren Zielort gelangen. Je nach Kompartiment bzw. Organell werden unterschiedliche Modifikationen der Membran erfolgen, damit sämtliche in Zellen vorhandenen Membranen die typischen Merkmale einer Biomembran zeigen.

Die Fluidität der Membranlipide ist auch wichtig, weil viele Membranprozesse, z.B. Transport und Signaltransduktion, davon abhängig sind. Bezüglich Fluidität gibt es zwei Phasen, nämlich die geordnete, starre Phase und die relativ ungeordnete, flüssige Phase, dabei ist die Transitionstemperatur die Grenze. Über der Transitionstemperatur kommt die flüssige Phase der Membran vor. Die Länge der Fettsäurereste und die Formation der Doppelbindung in den Fettsäureresten beeinflussen die Transitionstemperatur. (Stryer Biochemie, Edited by Berg, J.M., Tymoczko, J.L. and Stryer, L.)

2.3 Phospholipid

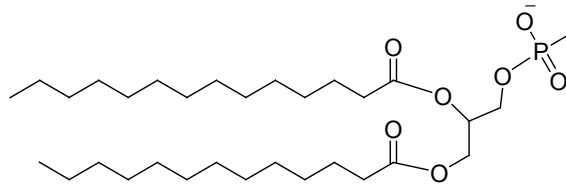
Wie erwähnt, sind Phospholipide reich in allen biologischen Membranen vorhanden. Generell enthält ein Phospholipidmolekül vier unterschiedliche Teile, sie sind eine Fettsäure, eine Plattform, ein Phosphat und eine Gruppe mit Hydroxygruppen.

Die Fettsäure funktioniert wie eine hydrophobe Barriere in der Doppelschichtstruktur, und richtet sich wegen lipophilen Wechselwirkungen ordentlich aus. Der Rest des Moleküls hat hydrophile Eigenschaft.

Die Plattform ist Glycerol oder Sphingosin, woran die Fettsäuren und das Phosphat kovalent binden können.

Die Gruppen, welche vorher Hydroxygruppe enthalten, können Cholin, Ethanolamin, Serin, Glycerol und Inositol sein (Abb. 2.3).

a



Phosphatidylteil

b

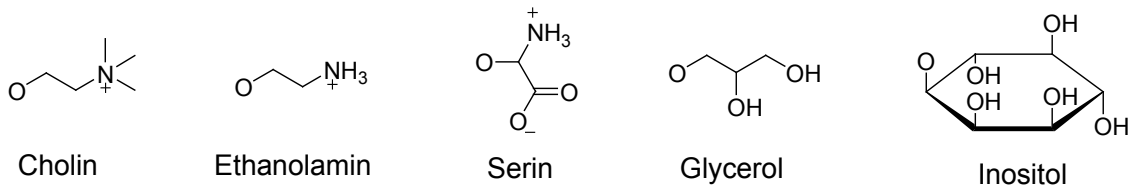


Abb. 2.3 Bestandteile des Phospholipids a) Phosphatidylteil (Ester aus Fettsäuren, Glycerol und Phosphat), b) häufig auftretende Kopfgruppen, von links nach rechts sind es Cholin, Ethanolamin, Serin, Glycerol und Inositol. Die entsprechenden Phospholipide sind PC, PE, PS, PG und PI.

Die Phospholipide, welche in dieser Arbeit verwendet wurden, sind das Egg Phosphatidylcholin (EPC) und das 1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphatidylcholin (DPPC), die Strukturformeln sind in Abb. 2.4 abgebildet.

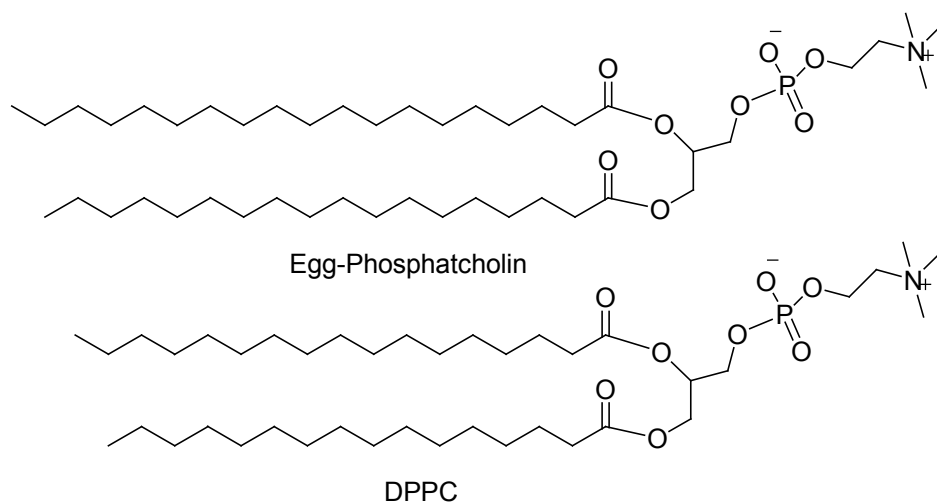


Abb. 2.4 Strukturformeln vom EPC und DPPC

3. Verteilungskoeffizient

3.1 Verteilungskoeffizient aus dem 1-Oktanol-Wasser-System

Die Verteilung einer Substanz zwischen einer mit Wasser unmischbaren organischen Phase und einer wässrigen Phase ist häufig das Kriterium für die Bestimmung der Lipophilie der Substanz. Je lipophiler eine Substanz ist, desto mehr wird sie in der organischen Phase angereichert.

In der Vergangenheit wurden unterschiedliche organischen Phasen zur Messung der Verteilung eingesetzt, Beispiele sind Olivenöl, Benzol, Cyclohexan, Chloroform und 1-Oktanol usw. Davon ist 1-Oktanol das Wichtigste (Pauletti et al. 1994 und Smith et al. 1975). Das 1-Oktanol-Wasser-System ist fast als ein standardisiertes System seit langem für die Bestimmung der Lipophilie von Substanzen verwendet.

Die Gleichgewichtskonstante in einem solchen System wird dann als Verteilungskoeffizient P (auch als K_{ow}) bezeichnet, welches wie folgt definiert wird.

$$P = C_o / C_w \quad (2-1)$$

C_o ist die Konzentration einer Substanz in der 1-Oktanolphase und C_w ist die Konzentration derselben Substanz in der Wasserphase (Leo et al. 1971 und Kaufman et al. 1975). Falls es in einer Phase unterschiedliche Spezies von einer Substanz gibt, sollen C_o und C_w durch die Summe der Konzentration von den unterschiedlichen Spezies der Substanz in der selben Phase ersetzt werden, und der Verteilungskoeffizient wird dann als D bezeichnet (Clarke et al. 1987).

3.1.1 Bestimmung der Verteilungskoeffizienten mit Potentiometrie

Potentiometrie ist das am häufigsten verwendete Verfahren zur Bestimmung von Verteilungskoeffizienten bezogen auf das 1-Oktanol-Wasser-System und wird auch als pH-metrische Methode bezeichnet.

Die pH-metrische Technik bringt sowohl die Ionisationskonstante pK_a als auch die $\log P$ -Werte von ionisierbaren Substanzen hervor, und basiert auf zwei nachfolgenden Titrationsen. Zuerst wird die in Wasser gelöste Substanz mit Säure oder Base titriert, und dadurch wird die Ionisationskonstante pK_a bestimmt. Anschließend wird die Titration in Anwesenheit von einer isotropischen 1-Oktanolphase wiederholt, und eine neue Ionisationskonstante pK_a' wird ermittelt. Da die Substanz in der organischen Phase verteilt werden

kann, gibt es eine Verschiebung des pK_a , wobei pK_a' von pK_a abweicht. Der Unterschied zwischen pK_a' und pK_a kann zur Berechnung von $\log P$ benutzt werden (Balen et al. 2004, Fruttero et al. 1998 und Avdeef 1992).

Falls es sich um die Titration einer einwertigen schwachen Säure handelt, und nur die protonierte Form der Säure in der organischen Phase verteilt wird, kann der Verteilungskoeffizient durch die unten gegebene Ausdrucksform berechnet werden,

$$P = (10^{pK_a' - pK_a} - 1)r \quad (2-2)$$

r ist das Volumenverhältnis zwischen wässriger Phase und 1-Oktanolphase, nämlich $r = V_w/V_o$ (Avdeef 1992 und Clarke 1984).

Falls eine einwertige schwache Base titriert wird, und nur die nicht protonierte Form der Base in die organische Phase gelangt, ist der Verteilungskoeffizient mit einer anderen ähnlichen Ausdrucksform zu berechnen, und zwar:

$$P = (10^{pK_a - pK_a'} - 1)r \quad (2-3)$$

Wenn beide Formen (protoniert und nicht protoniert) von einer einwertigen schwachen Säure oder Base in der organischen Phase verteilt werden können, gibt es den Verteilungskoeffizient D (Taillardat-Bertschinger et al. 2002b, Caron et al. 1997 und Clarke et al. 1987) für die dementsprechende Substanz.

$$D_{\text{Base}} = P^n \{1/(1+10^{pK_a - pH})\} + P^i \{10^{pK_a - pH}/(1+10^{pK_a - pH})\} \quad (2-4)$$

$$D_{\text{Säure}} = P^n \{1/(1+10^{pH - pK_a})\} + P^i \{10^{pH - pK_a}/(1+10^{pH - pK_a})\} \quad (2-5)$$

P^n ist der Verteilungskoeffizient von der neutralen Form der Substanz und P^i ist der Verteilungskoeffizient von der ionisierten Form der Substanz.

Für zwei- oder mehrwertige Säuren oder Basen bzw. deren Salze sind die Gleichungen zur Berechnung von P und D viel komplizierter (Avdeef 1992 und Clarke et al. 1987).

3.1.2 Shake-Flask-Methode zur Bestimmung von Verteilungskoeffizienten

Die Verteilung einer Substanz zwischen wässriger Phase und 1-Oktanolphase kann auch mit der Shake-Flask-Methode bestimmt werden.

Dabei sollen zuerst eine 1-Oktanolphase, welche durch Wasser gesättigt wird, und eine Wasserphase, welche durch 1-Oktanol gesättigt wird, vorbereitet werden. Dabei werden zwei große Flaschen mit jeweils 1-Oktanol oder bidestilliertem Wasser und genügender Menge von anderen Arten des Lösemittels für 24 Stunden geschüttelt, dann werden die beiden Flaschen lang genug still stehen gelassen, bis die Phasen eindeutig abgrenzt werden. Die gegenseitig gesättigten Phasen können erhalten werden. Für weitere Untersuchungen werden die vom Wasser gesättigte 1-Oktanolphase und die vom 1-Oktanol gesättigte Wasserphase gebraucht. Zweiphasige Systeme mit

unterschiedlichen Volumenverhältnissen von der 1-Oktanolphase und der Wasserphase (1:1, 1:2 und 2:1) sollen vorbereitet werden. Substanz wird in dem von Wasser gesättigten 1-Oktanollösemittel gelöst und nach Festlegung der Konzentration kann die gebrauchte Menge von der Substanzlösung ins zweiphasige System gegeben werden. Das zweiphasige System soll dann mit einer Schüttelapparatur oder per Hand geschüttelt werden, bis das Gleichgewicht der Verteilung in den zwei Phasen erreicht wird. Proben der 1-Oktanolphase und der Wasserphase werden genommen, und die Konzentration der Substanz wird mit UV/VIS oder anderen Detektionsmethoden bestimmt (Hitzel et al. 2000 und Gulyaeva et al. 2002).

3.1.3 Nachteile des 1-Oktanol-Wasser-Systems

Die Bestimmung des Verteilungskoeffizients ist sehr zeitaufwendig. Nach jeder Titration muss auf das Gleichgewicht gewartet werden. Um die Lipophilie einer Substanz zu bestimmen, werden eventuell auch unterschiedliche Volumenverhältnisse von Wasser und 1-Oktanol gebraucht. Die Genauigkeit des Volumenverhältnisses könnte das Ergebnis beeinflussen. Für die Substanzen, die entweder sehr hydrophil oder sehr lipophil sind, ist diese Methode sehr beschränkt (Balen et al. 2004).

Die organische Phase ist isotropisch und hat keine Zwitterionenform des Phospholipids, welches die Hauptkomponente der Biomembran darstellt. Die elektrostatische Wechselwirkung kann nicht in der organischen Phase widerspiegelt werden.

3.2 Verteilungskoeffizient aus Liposomen-Wasser-System

Das Liposomen-Wasser-System ist ein ähnliches System wie das 1-Oktanol-Wasser-System, dabei wird statt der organischen Phase eine Liposomensuspension verwendet. Die Liposomensuspension ist anisotropisch, nicht wie die organische Phase, welche isotropisch ist. Aufgrund der chemischen und strukturellen Ähnlichkeit von Liposomen mit Biomembranen kann die Verteilung einer Substanz in Liposomdoppelschichten die wirkliche Verteilung der Substanz in Biomembranen besser widerspiegeln.

3.2.1 Messung der Verteilung im Liposomen-Wasser-System

3.2.1.1 Potentiometrie

Die Theorie ist prinzipiell identisch mit der Messung mit der pH-metrischen Methode des 1-Oktanol-Wasser-Systems (Fruttero et al. 1998 and Avdeef et al. 1998). Die Gleichungen für die Berechnung von P und D können auch in diesem Fall verwendet werden. Häufig wird aber der Verteilungskoeffizient mit P_{Lip} bzw. D_{Lip} dargestellt.

3.2.1.2 Gleichgewichtsdialyse

Für die Gleichgewichtsdialyse ist neben einer wässrigen Substanzlösung und einer Liposomensuspension, eine Dialysezelle wichtig. Die Dialysezelle besteht aus zwei Kammern, welche durch eine halbdurchlässige Membran getrennt sind. Die halbdurchlässige Membran lässt die Durchquerung von Wasser- und Substanzmolekülen zu, aber die Durchquerung von Liposomen ist nicht möglich.

Eine Kammer wird mit 1mL wässriger Substanzlösung (häufig 1mM) befüllt und 1 mL Liposomensuspension wird in die andere Kammer gegeben. Abgesehen davon wird eine Referenzzelle eingesetzt wobei in eine Kammer 1mL wässriger Puffer eingefüllt und in eine andere Kammer 1mL Liposomensuspension eingefüllt wird. Nach Rotation unter 3 rpm für 5 Stunden bei Raumtemperatur kann das Gleichgewicht erreicht werden und der pH-Wert in jeder Kammer wird gemessen. Die Konzentration der Substanz in der wässrigen Kammer wird mit UV-Spektroskopie bei λ_{max} der Substanz bestimmt. Für die Berechnung des Verteilungskoeffizienten D_{Lip} gibt es folgende Gleichung:

$$D = V_L(C_L - C_B)/(V_{Lip} \cdot C_B) \quad (2-6)$$

C_B ist die Konzentration der Substanz in der wässrigen Kammer, und C_L ist die Konzentration der Substanz in der liposomalen Kammer. V_L ist das Volumen der wässrigen Kammer (1mL), und V_{Lip} ist das Volumen von Liposomen in der Suspension (Taillardat-Bertschinger et al. 2002b und Balen et al. 2004).

Wenn es sich um die Bestimmung des Verteilungskoeffizienten von sehr lipophilen Substanzen handelt, wird häufig organisches Lösungsmittel, z.B. DMSO, in die wässrige Substanzlösung gegeben und der Anteil des organischen Lösungsmittels beträgt ein paar Prozent, damit die Substanzen besser löslich sind.

3.2.1.3 Beschränkung des Liposomen-Wasser-Systems

Das Liposomen-Wasser-System ist sehr zeitaufwendig. Weil jede Messung einem pH-Wert entspricht, falls der Verteilungskoeffizient bei unterschiedlichen pH-Werten zu messen ist, wird viel Zeit gebraucht, um z.B. auf das Gleichgewicht zu warten usw. Die Konzentration von Lipid und das molare Lipid-Substanzlösung-Verhältnis soll für jede Substanz optimiert werden, was auch zeitaufwendig ist.

4. Chromatographische Methoden zur Untersuchung der Wechselwirkung

4.1 Immobilisierte-Artifizielle-Membran Chromatographie (IAM)

4.1.1 Einleitung

IAM ist eine neue chromatographische Methode, welche vor gut zwanzig Jahren entwickelt wurde. Dabei werden Phospholipidmoleküle (meistens Phosphatidylcholin) durch mehrstufige Reaktionen (Abb. 4.1) kovalent an die Oberfläche des Silicapartikels, welches zuerst mit Aminopropylgruppen modifiziert wird, gebunden (Pidgeon et al. 1989 & 1990). Dann werden die nicht reagierten Aminreste mit Methylglycolat bzw. mit Decanylgruppen (C10) oder Propylgruppen (C3) abgedeckt (Yang et al. 1996), diese neu eingeführten Gruppen sind parallel zu den hydrophoben Teilen des Phospholipids und können als Bestandteile der hydrophoben Schicht der Membran betrachtet werden. Es besteht dann keine unspezifische Wechselwirkung zwischen den zu untersuchenden Substanzen und der Aminogruppen enthaltenen Gelmatrix.

4.1.2 Strukturvergleich von Zellmembran, Liposom und IAM

Wie beschrieben besteht die chromatographische Oberfläche der stationären Phase von IAM nur aus einer Monoschicht von Phospholipiden (Kaliszan et al. 1994, Nasal et al. 1995, Chan et al. 2005, und Yen et al. 2005), diese Membranstruktur ist unterschiedlich im Vergleich zu der Doppelschichtstruktur der Zellmembran und des Liposoms. Allerdings, die polaren Kopfgruppen der immobilisierten Lipide ragen aus der Oberfläche der stationären Phase hervor und sind das erste Kontaktgebiet zwischen Substanzen und IAM (Nasal et al. 1995 und Pehourcq et al. 2003); der lipophile Teil verursacht die hydrophobe Wechselwirkung. So zeigt die aufgepfropfte Lipidmembran Ähnlichkeit zu Liposom und Zellmembran (Hernando et al. 2005).

Der Strukturvergleich von IAM, Liposom und Membran (Teil der Membran, flachförmig) ist in Abb. 4.2 zu sehen.

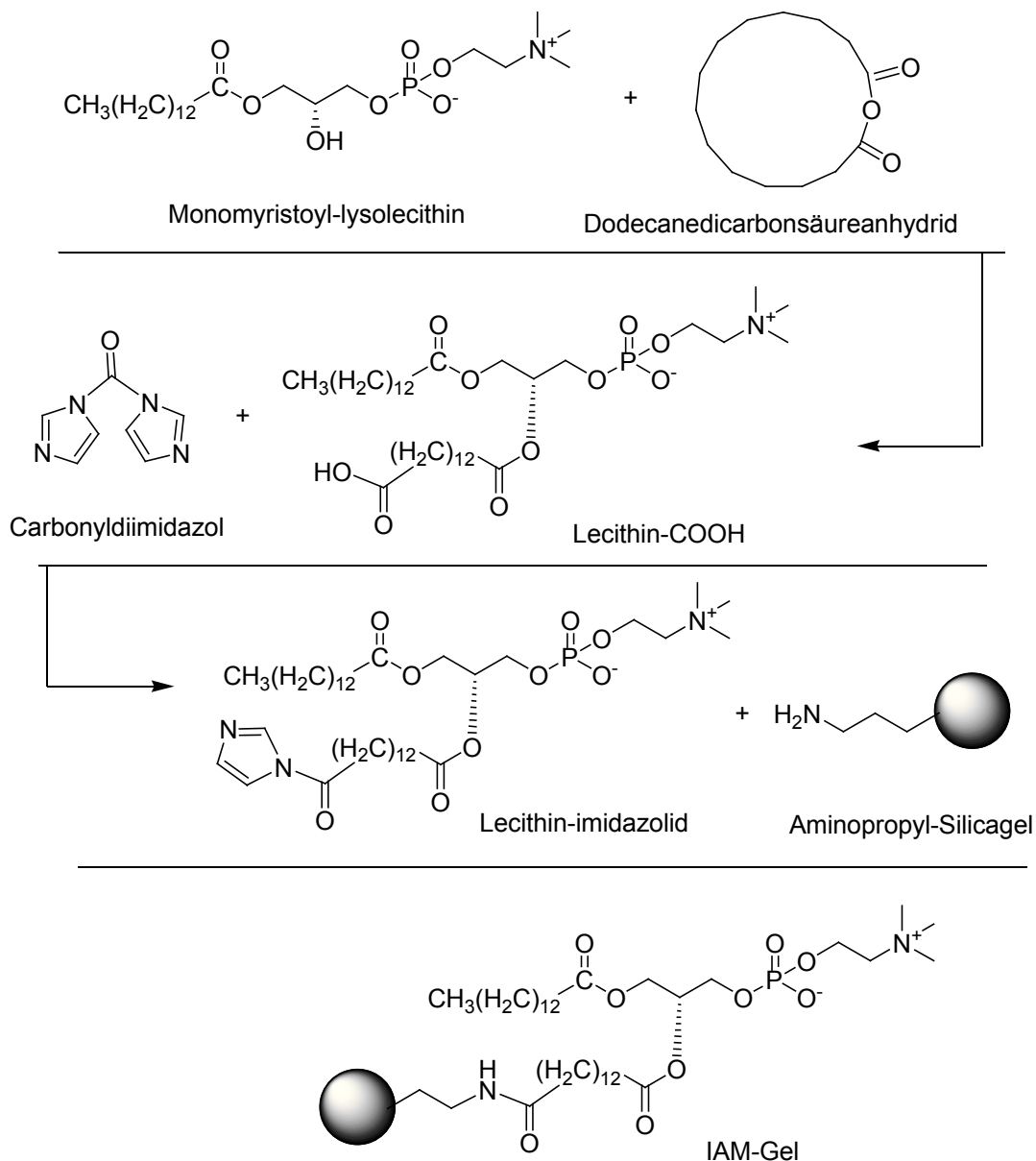


Abb. 4.1 Mehrstufige Reaktionen zur Herstellung von IAM-Gel

4.1.3 Kapazitätsfaktor k_{IAM}

Für IAM wird der Kapazitätsfaktor wie folgt definiert:

$$k_{IAM} = (t_R - t_0) / t_0 = (V_R - V_0) / V_0 \quad (4-1)$$

V_R ist das Retentionsvolumen und t_R ist die Retentionszeit einer Substanz. V_0

ist das Totvolumen und t_0 ist die Totzeit einer IAM-Säule. (Ong et al. 1996, Vrakas et al. 2006&2008, Taillardat-Bertschinger et al. 2002a)

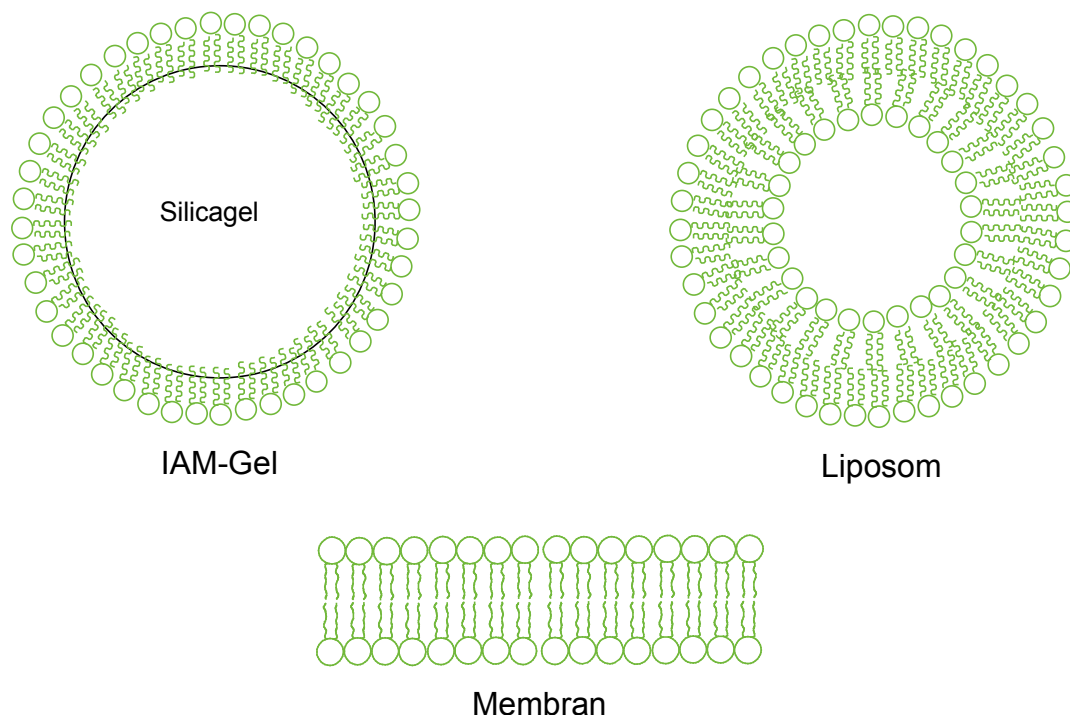


Abb. 4.2 Strukturvergleich von IAM (oben links), Liposom (oben rechts) und Membran (unten)

4.1.4 Nomenklatur

Weil unterschiedliche artifizielle Membranen hergestellt werden können, ist es notwendig ihnen eine wissenschaftliche Nomenklatur zu geben. Dafür tritt IAM immer in der Nomenklatur auf, bezogen auf das Phospholipid, welches kovalent an die modifizierte Oberfläche des Silicagels gebunden wird, wird neben IAM die Art des Lipids beschrieben. z.B. gibt es IAM.PC, IAM.PE, IAM.PS, IAM.PA und IAM.PG, wobei Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin, Phosphorsäure und Phosphatidylglycerol aufgepfropft sind (Abb. 4.3).

Der obere Index, welcher links von z.B. IAM.PC steht, dient dazu, die wesentlichen strukturellen Unterschiede des Phospholipids zu verdeutlichen.

Der Index 'Ester' bedeutet eine Esterbindung zwischen zwei Acylketten und

dem Glycerolskelett des Phospholipids, und der Index 'Ether' bezieht sich auf eine Etherbindung zwischen einer Alkylgruppe und einem Phospholipid. Es ist auch deutlich zu sehen, dass die Esterbindung zwei Acylgruppen anweist, und die Etherbindung eine einzige Alkylgruppe anweist. Der Index δG repräsentiert die Mangelhaftigkeit von Glycerolskelett des Phospholipids, die polare Kopfgruppe ist dann direkt an die Alkylgruppe durch eine Phosphoesterbindung gebunden.

Der obere Index, welcher ganz rechts steht, weist auf die Endabdeckung hin. Früher wurde Methylglycolat verwendet, um die nicht reagierten Aminogruppen abzuschirmen. Dann wurden Alkylgruppen zu diesem Zweck benutzt, dabei wurden langkettigen Decanoylgruppen zur Reaktion gebracht, danach deckten Propionacylgruppen die restlichen Aminogruppen ab (Yang et al. 1996).

Das erwähnte IAM-Gel, $\delta G_{IAM.PC^{C10/C3}}$, wurde auch als IAM.PC.DD bezeichnet, und $Ester_{IAM.PC^{C10/C3}}$ wurde als IAM.PC.DD2 bezeichnet. DD bedeutet *drug discovery*. Generell werden DD- und DD2-Säule zur Untersuchungen der Bindung des Arzneimittels an der Membran und der Permeabilität des Arzneimittels durch Zellen verwendet (Ward et al. 2003). Die Strukturen von drei IAM.PC^{C10/C3}-Gelen sind in Abb. 4.3 gezeigt.

Es gibt außer den ausgewiesenen artifiziellen Membranen, auch Membranen mit gemischten Lipiden. Meistens werden Phosphatidylcholine zuerst durch Etherbindungen kovalent verknüpft und dann andere Phospholipide, z.B PS, PE usw, durch Etherbindungen kovalent gebunden. Solche Materialien werden als $Ether_{IAM.PC/PS^{C10/C3}}$ und $Ether_{IAM.PC/PE^{C10/C3}}$ usw. bezeichnet.

Die Strukturen von $Ether_{IAM.PA^{C10/C3}}$, $Ether_{IAM.PE^{C10/C3}}$, $Ether_{IAM.PG^{C10/C3}}$ und $Ether_{IAM.PS^{C10/C3}}$ werden in Abb. 4.4 gezeigt.

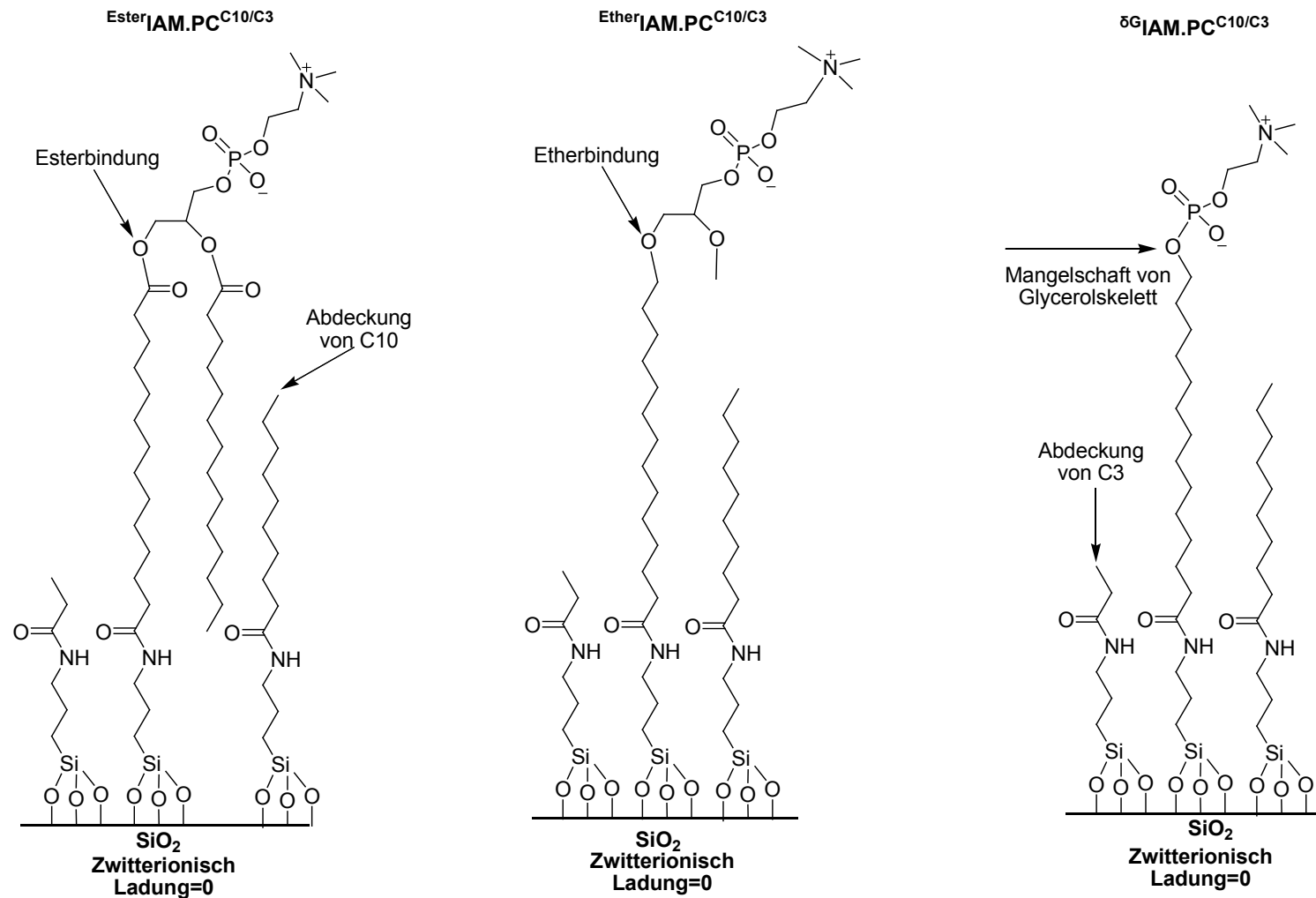


Abb. 4.3 Strukturen von $\text{IAM.PC}^{\text{C10/C3}}$, $\text{IAM.PC}^{\text{C10/C3}}$ und $\text{IAM.PC}^{\text{C10/C3}}$

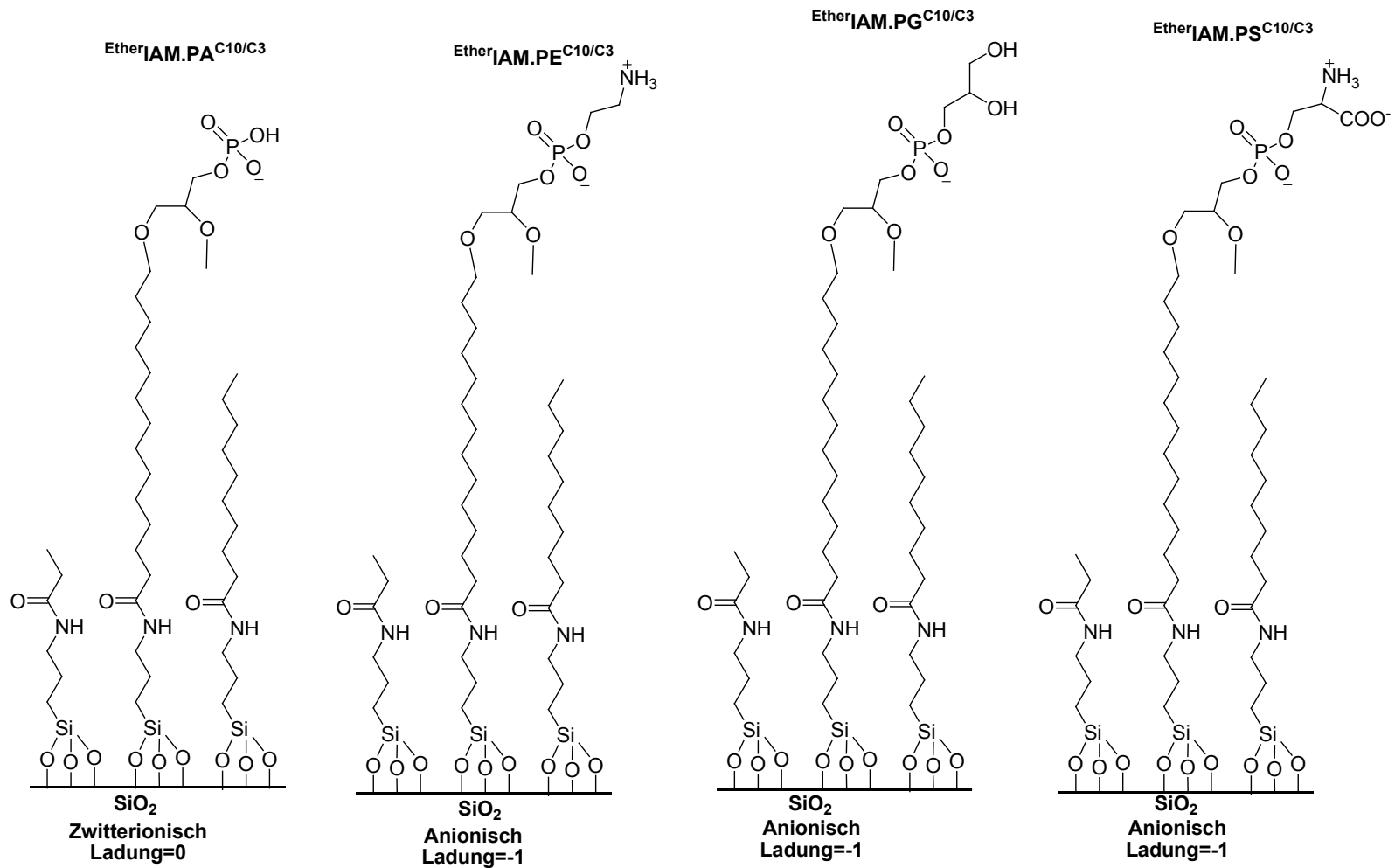


Abb. 4.4 Strukturen von EtherIAM.PA^{C10/C3}, EtherIAM.PE^{C10/C3}, EtherIAM.PG^{C10/C3} und EtherIAM.PS^{C10/C3}

4.1.5 Dichte des Lipids

Als Beispiel wird die Deckung des Phospholipids an dem in Abb. 4.1 gezeigten IAM-Gel betrachtet. Das Ausgangsprodukt, das mit Propylaminen modifizierte Silicagel, hat eine Oberflächendichte von $1,64 \mu\text{mol-Propylamin}/\text{m}^2$, sprich $101 \text{ \AA}/\text{Molekül}$, aber es wurde angenommen, dass nicht alle Oberflächen zugänglich für die Propylamine sind, und $1,64 \mu\text{mol-Propylamin}$ dicht genug nebeneinander an den zugänglichen Oberflächen gebunden wird. Die Projektion einer Propylamingruppe beträgt $\text{ca. } 25 \text{ \AA}^2$, und die Fläche, die ein Lecithinmolekül in einer Membran besitzt, ist $66\text{-}77 \text{ \AA}^2$. Daher kann ungefähr $1/3$ der Propylamingruppe weiter mit Lecithinen modifiziert werden, sprich $\text{ca. } 0,62\text{-}0,64 \mu\text{mol}/\text{m}^2$. (Pidgeon et al. 1989)

Falls alle Oberflächen als zugänglich betrachten werden würden, würde aber jedes Lecithinmolekül eine Fläche von ungefähr 260 \AA^2 besitzen.

4.1.6 Anwendung

Nachdem die Methode der IAM-Chromatographie entwickelt wurde, wurde diese Chromatographie in vielen Bereichen verwendet. Sie wurde für die Proteinreinigung (Pidgeon et al. 1991) und für die Untersuchung der quantitativen Struktur-Retention-Beziehung (QSRR: quantitative structure-retention relationship) (Li et al. 2006&2007) verwendet, außerdem hat IAM-Chromatographie die folgende Anwendungen:

- 1.) Voraussagung der Verteilung von Substanzen in Membranen (Ong et al. 1995),
- 2.) Voraussagung der Permeabilität eines Arzneimittels durch Caco-2-Zellen (Pidgeon et al. 1995 und Chan et al. 2005)
- 3.) Schätzen von Wechselwirkungen zwischen Gallensalzen und Membranen (Cohen et al. 1995)
- 4.) Erhalten von hydrophoben Parametern (Kaliszan et al. 1994 und Nasal et al. 1995).

4.1.7 Stabilität der IAM-Phase

Da die artifizielle Membran der IAM-Chromatographie eine Monoschicht von Phospholipiden ist, die kovalent an Silicagel gebunden werden, soll diese Monoschicht stabil gegen Detergens, organische Lösungsmittel und auch gegen hohen Druck sein. Tatsächlich ist sie gegen manche organische

Lösungsmittel relativ stabil, z.B. Aceton und Acetonitril. Aber manche andere organische Lösungsmittel können die Kohlenwasserstoffe der IAM-Phase auswaschen. Chloroform, Ethanol, Methanol, Ethylacetat und Methylenchlorid sind ein Paar davon. Sie haben absteigendes Vermögen, die Kohlenwasserstoffe auszuwaschen. (Markovich et al. 1989)

Normalerweise wird ein wässriger Puffer als Eluent benutzt und gelegentlich auch Acetonitril, dessen Anteil häufig unter 30% bleibt. Daher ist die IAM-Phase relativ stabil und könnte für Untersuchung relativ lange gebraucht werden.

Aber man muss daran denken, dass Hydrolysemöglichkeit besteht, die nicht vermieden werden konnte. Die Retention von einer Substanz kann dementsprechend im Laufe der Verwendungszeit erniedrigt werden.

4.2 Immobilisierte-Liposomenen-Chromatographie (ILC)

4.2.1 Einleitung

Die Immobilisierte-Liposomen-Chromatographie ist eine relativ neue Methode, welche in den vergangenen 25 Jahren entwickelt wurde und immer mehr verwendet wird. Die Idee von dieser chromatographischen Methode liegt darin, dass Liposomen an einer gewissen Gelmatrix, welche als Support oder Träger fungiert, immobilisiert werden und das Ganze als Säulenmaterial in einer chromatographischen Säule gepackt und zur Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Liposomen und Arzneimitteln bzw. chemischen Verbindungen gebracht wird.

Aufgrund der strukturellen und chemischen Ähnlichkeit zwischen einem Liposom und einer Membran kann sich die Wechselwirkung von einer Verbindung mit Membranen in der Wechselwirkung derselben Verbindung mit Liposomen widerspiegeln. Daher ist ILC eine attraktive chromatographische Methode. Allerdings, weil die Immobilisation unter Vorhandensein eines Supports realisierbar ist, ist der Support ein großer Teil des Gelbettes. Deswegen besteht die Möglichkeit, dass die Oberfläche des Supports zur gesamten Wechselwirkung beiträgt, aber dies stört die Messungsergebnisse und sollte so klein wie möglich sein.

4.2.2 Anwendungen

ILC wird am häufigsten für die Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Membranen und Arzneimitteln bzw. chemischen Verbindungen eingesetzt. (Liu et al. 2002, Lundahl et al. 1997 und Zhang et al. 1996) Die Wechselwirkung spiegelt die Verteilungen von Arzneimitteln bzw. Verbindungen in der Membrandoppelschicht wider und die Verteilungen beziehen sich auf die Absorption der Arzneimittel und Verbindungen im menschlichen Körper. Daher kann ILC zur Bestimmung der Verteilung eines Arzneimittels in der Membran und für die Vorhersage der Absorption des Arzneimittels verwendet werden. (Beigi et al. 1995&1998, Österberg et al. 2001, Yang et al. 1999b und Boija 2006)

Eine andere wichtige Verwendung von ILC ist die Trennung von Proteinen, Peptiden (Yang et al. 1990 und Zhang et al 1994) und chinesischen Kräuterextrakten. (Mao et al 2002)

Falls ein bestimmtes Membranprotein, z.B Glucosetransprotein (Glut1), in Liposomen eingebaut werden kann, kann die Assoziationskonstante von einer Substanz oder einer konkurrierenden Substanz, z.B D-Glucose und Cytochalasin B (Inhibitor von Glut1), an dem Protein durch ILC bestimmt werden. (Yang et al. 1995 und Brekkan et al 1996)

4.2.3 Immobilisierung von Liposomen

Die Immobilisierung von Liposomen kann durch verschiedene Methoden realisiert werden. Diese Methoden sind sterische Immobilisierung, Immobilisierung durch hydrophobe Wechselwirkungen, Immobilisierung durch Affinität von Avidin mit Biotin und Immobilisierung durch kovalente Bindungen.

4.2.3.1 Sterische Immobilisierung

Für die sterische Immobilisierung von Liposomen sind angemessene Liposomenträger notwendig. Die Träger fungieren als Support der Liposomen und sind meistens Gelmatrizen für die Gelfiltration. Diese Gelmatrizen enthalten viele Poren bzw. Hohlräume, die für Einschließung und Festhalten von Liposomen geeignet sind. Am häufigsten wird Superdex 200 (siehe 7.1.1) verwendet, zudem können Sepharose 6B, Sepharose 4B, Sepharose 2B, Sephacyl S1000, Superose 6 und TSK-Gel zur Verwendung gebracht werden.

4.2.3.1.1 Immobilisierung durch Dialyse von Detergens-Lipid-Lösung in Gegenwart von einer Gelmatrix

Für die Immobilisierung durch Dialyse muss zuerst eine Phospholipidlösung hergestellt werden. Die Lösung besteht normalerweise aus Phospholipid, Cholsäure oder Oktylglucoside und einem gewissen Puffer. Die Konzentration des Phospholipids liegt zwischen 20 mM bis 50 mM.

Nach der Fertigstellung der Lösung, werden ca. 3 mL davon langsam in eine Sepharose 6B-Säule oder in eine Sephacyl S-1000-Säule gepumpt. Das Gel wird dann von der Säule in eine Dialysezelle überführt und gegen den Puffer 2,5 Tage bei 22 °C dialysiert. Das neue Gelmaterial nach der Dialyse enthält immobilisierte Liposomen, muss aber ein paar mal gewaschen werden, um die nicht immobilisierten Liposomen wegzuwaschen. (Wallsten et al 1989 und Yang et al 1990a and 1990b)

Die Immobilisierung von Liposomen durch Dialyse ist zeitaufwendig und wird immer weniger verwendet.

4.2.3.1.2 Immobilisierung durch Mischung von Liposomensuspension mit Gelmatrizen

Für diese Art von Immobilisierung sind eine unilamellare Liposomensuspension und eine passende Gelmatrix zwei wichtige Teile. Unilamellare Liposomen können durch Rehydratation von einem Phospholipidfilm und anschließend Behandlung mit Ultraschall oder durch Extrusion zustande kommen. Bei der Vorbereitung von Phospholipidfilm kann entweder ein einziges Phospholipid oder ein Gemisch von unterschiedlichen Phospholipiden bzw. anderen Lipiden eingesetzt werden. Die Konzentration der Liposomen ist häufig nicht niedriger als 100 mM.

Die am häufigsten verwendete Matrix ist Superdex 200. Superdex besteht aus quervernetzten Agarosen mit aufgepfropften Dextranen und hat Hohlräume (zwischen 100 nm und 300 nm) bzw. Poren (7 nm bis 60nm) (Österberg et al. 2001). Aufgrund der Rigidität von Superdex kann die Elution bei einer relativ

hohen Flußrate durchgeführt werden. Dabei gibt es nur eine kleine Änderung des Gegendrucks. (Brekkan et al. 1995)

Um ein volles Bettvolumen von Gelmaterial für eine HR5/5 Säule zu erhalten, wird normalerweise 1,5 mL einer 100 millimolarigen Liposomensuspension mit 110 mg Superdex gemischt. Das Superdex soll zuerst mit Ethanol gewaschen und getrocknet werden. (Beigi et al. 1998 und Brekkan et al. 1996) Wenn das getrocknete Superdex mit der Liposomensuspension gemischt wird, werden die Liposomen in die Hohlräume von den Superdexperlen gesaugt. Gleichzeitig fangen die Superdexperlen an zu rehydratisieren und schwellen, daher werden die Liposomen sterisch in den Hohlräumen immobilisiert (Abb. 4.5).

Die Menge der Liposomen, welche in Superdex immobilisiert werden können, kann durch Einfrieren und anschließend Auftauen erhöht werden. Während den Wiederholungen von Einfrieren und anschließend Auftauen steigert sich die Fusion der Liposomen (Abb. 4.5). Nach den Untersuchungen von Einfluss der Einfrierungstemperatur auf die Immobilisierung wurde die beste Einfrierungstemperatur gefunden, nämlich bei -25°C , und die Auftautemperatur liegt bei 25°C .

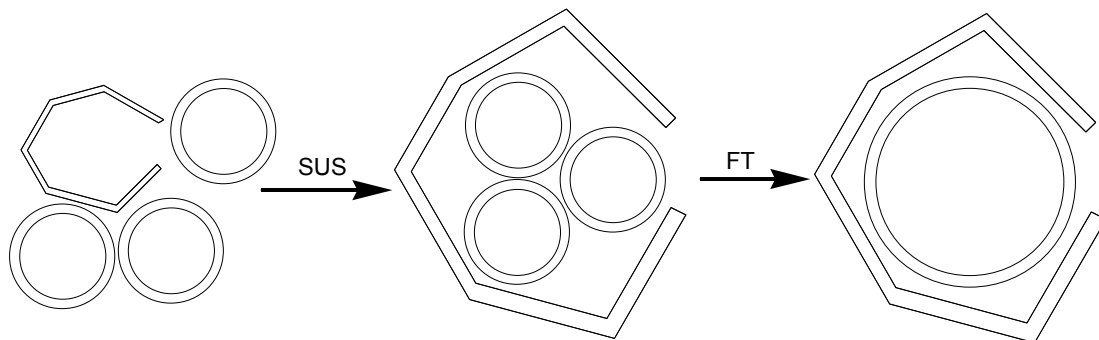


Abb. 4.5 Immobilisierung von Liposomen in einem Hohlraum durch Ansaugen beim gleichzeitigen Schwellen des Superdexes (SUS: Suction Upon Swelling) und Einfrieren-Auftauen (FT: Freeze-Thawing)

Die Konzentration der Liposomen in der Suspension ist ein sehr wichtiger Faktor, der die Immobilisierung beeinflussen kann. Bei höherer Konzentration können mehrere Liposomen in die gleichen Hohlräume beim gleichzeitigen Schwellen von Superdexperlen angesaugt werden. Das erniedrigt die Wahrscheinlichkeit, dass die Liposomen wieder aus den Hohlräumen durch die Poren herauskommen. Darüber hinaus verbessern mehrere Liposomen in

einem gleichen Hohlraum auch die Fusion zwischen den Liposomen, falls der Einfrieren-Auftauen-Vorgang durchgeführt würde.

Liposomen werden in dem äußereren Bereich von einer Gelperle immobilisiert, und im Innenteil mangelt es an Liposomen (Abb. 4.6). Liposomen werden in die Gelperle bei ihrem gleichzeitigen Schwellen eingesaugt, und können nicht den Kern einer Perle erreichen, weil die Front des Wassers schneller als Liposomen bei der Rehydratation läuft. (Lundqvist et al. 1998)

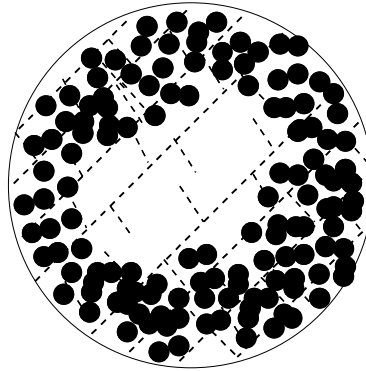


Abb. 4.6 Darstellung eines Querschnitts einer Gelperle, Mangel an Liposomen im Innenteil (schwarze Punkte : Liposomen)

Die Gelmatrizen, die für die Immobilisierung verwendet werden können, sind außer Superdex 200 noch Sepharose 4B (Zhang et al. 1995), Sepharose 2B (Yang et al. 1994), Sephacryl S-1000 (Yang et al. 1994) und TSK-Gel (Brekkan et al. 1995).

4.2.3.2 Immobilisierung durch hydrophobe Wechselwirkungen

Für diese Art von Immobilisierung können einige Träger verwendet werden. Es sind Sepharose 4B bzw. Sepharose 6B (Sandberg et al. 1987 und Lundahl et al. 1991), Sepharose 2B (Yang et al. 1988 und Lundahl et al. 1991) und Sephacryl S-1000 (Yang et al. 1988, Lu et al. 1993 und Lundahl et al. 1991). Diese Träger müssen aber zuerst mit 1,4-bis(2,3-Epoxypropoxy)butan aktiviert werden, und die aktivierten Träger werden dann mit Alkylmercaptan verknüpft. Dadurch kommen die Alkylsulfidderivate (Abb. 4.7) der Trägermaterialien zustande (Maisano et al. 1985, Lundahl et al. 1991, Sandberg et al. 1987 und Yang et al. 1988). Als Alkylmercaptan wird häufig Oktanylthiol benutzt, zudem auch Butyl- und Dodecylthiol. (Yang et al. 1988, Lu et al. 1993 und Lundahl et al. 1991)

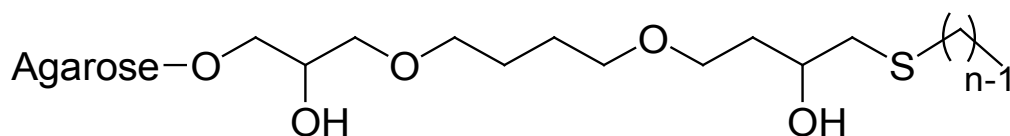


Abb. 4.7 Alkylsulfidderivat einer Agaroseperle, $n=4, 8$ und 12

Nachdem das Alkylsulfidderivat in eine Säule gepackt wurde, wird die Liposomensuspension langsam in die Säule gepumpt. Das zum Teil hydrophobe Abstandstück kann eventuell den Bereich von den Kopfgruppen der Liposomen durchstechen und die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen der Alkylkette des Ligands und den Fettsäureketten der Lipidmoleküle führen zur Immobilisierung von Liposomen.

4.2.3.3 Avidin-Biotin-Immobilisierung

Als Träger für die Avidin-Biotin-Immobilisierung werden Sephacryl S-1000 (Yang et al. 1998, Ohno et al. 2004 und Yang et al. 1999b), Superdex 200 (Yang et al. 1998 und Yang et al. 1999b), TSK G6000PW (Yang et al. 1998 und Yang et al. 1999b) und Sepharose 4B (Liu et al. 2002 und Yang et al. 1999b) eingesetzt. Vor der Immobilisierung werden Sephacryl S-1000, Superdex 200 und TSK G6000PW durch 4-Nitrophenylchlorofomat aktiviert und CNBr-Sepharose 4B soll mit Sepharose hergestellt werden. Das durch Chlorofomat aktivierte Sephacryl S-1000, Superdex 200, TSK G6000PW und das CNBr-Sepharose 4B werden dann mit Avidin derivatisiert. Liposomen, die nachher mit den mit Avidin derivatisierten Trägern verknüpft werden, sollen aus 1,2- Dioleoyl-phosphatidylethanolamine-N-(cap biotiny) (Biotin-cPE) und Phospholipiden hergestellt werden. Die Affinität zwischen den mit Avidin derivatisierten Trägern und den biotinylierten Liposomen lässt die Immobilisierung von Liposomen zu.

4.2.3.4 Immobilisierung durch kovalente Bindungen zwischen Trägern und Liposomen

Für die Immobilisierung von Liposomen durch kovalente Bindungen sind unterschiedliche Träger einsetzbar, aber diese müssen vor der Immobilisierung der Liposomen derivatisiert werden. In manchen Fällen ist eine Modifikation der Liposomen notwendig. Es gibt Immobilisierung durch Disulfidbindungen

und Immobilisierung durch kovalente Bindungen zwischen Liposomen und aktivierten Trägern.

4.2.3.4.1 Immobilisierung durch Disulfidbindungen

Sephacryl S-1000 wird als Träger verwendet und dazu ist die Derivatisierung vom Sephacryl mit 1,4-bis(2,3-Epoxypropoxy)butan oder die weitere Modifizierung von dem derivatisierten Sephacryl mit 2,2'-Dithiodipyridin ist notwendig (Khaleque et al, 2004). Liposomen, die 1-Oktanthiol, 1-Hexandecylthiol oder Thiocholersterol enthalten, werden hergestellt. Die Thioverbindungen können auch nach Vorbereitung von Liposomen darin eingegliedert werden (Khaleque et al, 2006). Die Reaktion zwischen dem modifizierten Träger und den mit Thioverbindungen eingegliederten Liposomen lässt die Immobilisierung von Liposomen zustande kommen (Abb. 4.8).

Die Art der Thioverbindungen in Liposomen und das molare Verhältnis können die Immobilisierung beeinflussen.

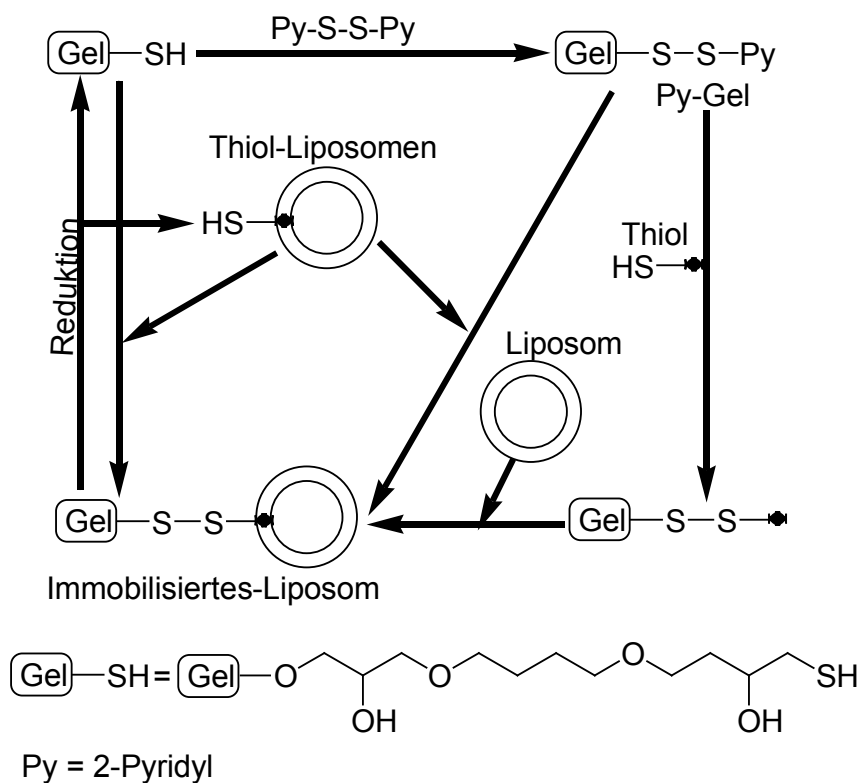


Abb. 4.8 Schematische Darstellung der Immobilisierung der Liposomen durch Disulfidbindungen (Khaleque et al, 2006)

4.2.3.4.2 Immobilisierung von Liposomen durch deren kovalente Verknüpfung mit aktivierten Gelmaterialien

Das mit Chloroformat aktivierte TSK oder Superdex 200, das mit CNBr aktivierte Sepharose 4B, das mit N-Hydroxysuccinimid und das mit Tresyl aktivierte TSK-Gel sind die verwendeten Gelmaterialien. Durch Mischung der den aktivierten Gelmaterialien mit einer Liposomensuspension, passiert der nucleophile Angriff von Liposomen an den aktivierten Gelmaterialien und Liposomen werden kovalent an den Gelmaterialien gebunden.

Das Gelmaterial, welches aktiviert wird, und die Zusammensetzung der Liposomen können die Immobilisierung beeinflussen. (Yang et al, 1999a)

4.2.3.4.3 Immobilisierung von Liposomen durch deren kovalente Bindung an Chloroformat aktiviertem Silicagel

Silicagel, welches zuerst mit 4-Nitrophenylchloroformat aktiviert wird, kann zur kovalenten Immobilisierung von Liposomen eingesetzt werden. Durch einen nucleophilen Angriff von eventuell negativ geladenem Sauerstoff des Phosphats an den elektronenarmen Carbonylkohlenstoff kommt eine kovalente Verknüpfung zustande. (Siehe auch Abschnitt 8.1: Ein reizvolles Model: Silicagel mit kovalent gebundenen Liposomen) (Mao et al, 2003)

4.2.4 Spezifischer Kapazitätsfaktor k_s

Die Immobilisierte-Liposomen-Chromatographie ist eine neue Methode und in einer ILC-Säule werden Liposomen aus Phospholipiden immobilisiert. Für die Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Arzneimitteln bzw. chemische Verbindungen und Liposomen spielt die Menge von Phospholipiden eine Rolle, allerdings, unterschiedliche Säulen mit unterschiedlicher Menge an Phospholipiden sollen die gleichen Ergebnisse bringen. Daher ist ein chromatographischer Parameter, der die Menge der Phospholipiden normieren kann, notwendig. Dieser Parameter ist der spezifische Kapazitätsfaktor k_s (oder k_{ILC}).

4.2.4.1 Spezifischer Kapazitätsfaktor unter Berücksichtigung von Wechselwirkungen mit einer Gelmatrix

Wenn die Wechselwirkung zwischen zu untersuchenden Substanzen und Gelmatrizen nicht vernachlässigt werden kann, sollte die Verlängerung der Retentionszeit oder Vergrößerung des Retentionsvolumens aufgrund dieser Wechselwirkung berücksichtigt werden. Die dementsprechende Gleichung für den spezifischen Kapazitätsfaktor lautet wie folgt

$$k_s \text{ (oder } k_{ILC}) = (V_R - V_0 - V_G)/A \quad (4-2)$$

Wobei V_R das Retentionsvolumen einer zu untersuchenden Substanz ist, V_0 ist das Retentionsvolumen einer Substanz, die nicht mit der stationären Phase wechselwirkt (häufig wird V_0 mit $K_2Cr_2O_7$ bestimmt), und V_G ist das Retentionsvolumen der zu untersuchenden Substanz in einer liposomenfreien Säule. A ist die Stoffmenge von Phospholipiden und kann durch Phosphat-Assay (siehe Abschnitt 8.4.1) bestimmt werden. (Boija 2006 und Boija 2004)

4.2.4.2 Spezifischer Kapazitätsfaktor ohne Berücksichtigung von Wechselwirkungen mit einer Gelmatrix

Falls die Wechselwirkung zwischen zu untersuchenden Substanzen und Gelmatrizen im Vergleich zu der Wechselwirkung mit Liposomen klein ist, kann der Einfluss vernachlässigt werden. Daraus ist eine vereinfachte Definition (Gleichung 4-3) von dem spezifischen Kapazitätsfaktor zu nutzen

$$k_s \text{ (oder } k_{ILC}) = (V_R - V_0)/A \quad (4-3)$$

Wobei V_R und V_0 identisch sind, wie in der obigen Definition (Beigi et al. 1998, Österberg et al. 2001 und Johansson et al. 2005).

4.2.5 Einfluss der Zusammensetzung des Liposoms auf die Retention

Wie beschrieben, Liposom kann durch unterschiedliche Phospholipide oder ein Gemisch von unterschiedlichen Phospholipiden vorbereitet werden. Das führt zur Vielfaltigkeit des Liposoms. Es ist auch bekannt, dass manche Phospholipide neutral sind, z.B. PC und PE, und dass manche Phospholipide negativ geladen sind, z.B. PS. Daher, je nach der Zusammensetzung, kann ein Liposom einen neutral polaren Bereich oder einen negativ geladenen polaren Bereich besitzen. Wenn die zu untersuchenden Substanzen unter experimentellen Bedingungen ionisierbar sind, und zwar enthalten sie

entweder positive oder negative Ladung, können die Retentionen von den Substanzen je nach ihrer Ladung bzw. der Art von immobilisierten Liposomen unterschiedlich sein.

Beispielsweise sind die Retentionen der positiv geladenen Substanzen (β -Blocker usw.) auf den Liposomen aus PC und PS stärker als die Retentionen der gleichen Substanzen auf den Liposomen nur aus PC. Darüber hinaus, je größer das molare Verhältnis zwischen PS und PC ist, desto stärker ist dann die Retention (Beigi et al. 1998 und Boija et al. 2004). Hier spielt die elektrostatische Wechselwirkung zwischen negativ geladenen Liposomen und positiv geladenen Substanzen eine Rolle. Umgekehrt wird die Retentionen der negativ geladenen Substanzen auf PS-haltigen Liposomen kleiner als auf PC-Liposomen (Österberg et al. 2001). Die neutralen Substanzen werden weniger durch die Ladungen im polaren Bereich des Liposoms beeinflusst.

4.2.6 Einfluss von Flussrate, Gelvolumen und Lipidmenge auf Retention und k_s

Falls sich die Flussrate erhöht, verkleinern sich sowohl das Retentionsvolumen einer zu untersuchenden Substanz als auch das Totvolumen, und nach Normierung bleibt k_s unverändert.

Das Gleiche gilt für das Gelvolumen. Wenn das Gelvolumen sich vergrößert, eventuell auch die darin enthaltene Lipidmenge, vergrößert sich das Retentionsvolumen einer Substanz. Aber aufgrund der Normierung, bezogen auf Lipidmenge A, bleibt k_s konstant. (Beigi et al. 1998 und Ohno et al. 2004)

Da die Flussrate, das Gelvolumen und die Lipidmenge keinen Einfluss auf den spezifischen Kapazitätsfaktor k_s haben, ist es möglich, eine relativ kurze und weniger Lipide enthaltende ILC-Säule zu verwenden. Das ermöglicht die Untersuchungen von lipophilen Substanzen in relativ kurzer Zeit. (Österberg et al. 2001)

4.2.7 Einfluss von Ionenstärke des Eluents, die Größe des Ions im Eluent, pH des Eluents und Lamellarität der Liposomen auf Retention und k_s

Die steigende Ionenstärke des Eluents führt normalerweise zum verkleinerten k_s -Wert, die Retention einer positiv oder negativ geladenen Substanz auf neutralen Liposomen wird durch die steigende Ionenstärke des Eluents abgeschwächt. Beispielsweise wenn die Konzentration von NaCl im Eluent

sich erhöht, werden die k_s -Werte von untersuchenden Arzneimitteln oder chemischen Verbindungen kleiner. (Diplomarbeit von Ping Fan und Beigi et al. 1998)

Aber die Änderung von k_s -Werten kann für negativ geladene Liposomen anderes sein. Mit steigender Ionenstärke (von 0,003 mol/L bis 0,05 mol/L) nehmen die k_s -Werte von positiv geladenen Arzneimitteln ab (Beigi et al. 1998), jedoch steigern sich die k_s -Werte von negativ geladenen Arzneimitteln (Boija et al. 2004).

Die Retentionen von neutralen Arzneimitteln werden fast nicht beeinflusst.

Abgesehen von Ionenstärke spielt die Größe der Ionen im Eluent eine Rolle. Wenn das Natriumion (Na^+) von NaCl im Eluent gegen das Lithiumion (Li^+) bei gleicher Ionenstärke getauscht wird, erhöhen sich die Retentionen von negativ und positiv geladenen Arzneimitteln auf neutralen Liposomen und die Erhöhung der k_s -Werte von negativ geladenen Arzneimitteln ist stärker. Neutrale Arzneimittel werden nicht beeinflusst. Falls LiCl im Eluent gegen LiF getauscht wird, erhöhen sich die k_s -Werte von positiv geladenen Arzneimitteln. Die k_s -Werte von negativ geladenen und neutralen Arzneimitteln bleiben fast unverändert. Die kleinen Ionen (Li^+ , F^-) können die Wechselwirkung zwischen Arzneimitteln und neutralen Liposomen beeinflussen. Das könnte eventuell daran liegen, dass diese kleineren Ionen tiefer in den polaren Kopfgruppenbereich eindringen, und dann die Wechselwirkung modifizieren (Boija et al. 2004).

Der pH-Wert des Eluents kann die Ladungen von ionisierbaren Substanzen und Liposomen durch Protonierung und Deprotonierung beeinflussen. Daher kann die Änderung des pH-Wertes die Änderung der Retention verursachen. Beispielsweise mindern sich die Retentionen von positiv geladenen Arzneimitteln auf negativ geladenen PS-PC-Liposomen mit steigendem pH-Wert von 9 bis 11 (Boija et al. 2004).

Die Lamellarität von Liposomen kann k_s -Werte beeinflussen. Falls nur unilamellare Liposomen in einer ILC-Säule immobilisiert werden, stehen dann alle Membranoberflächen zur Wechselwirkung zur Verfügung. Jedoch, wenn multilamellare Liposomen in einer ILC-Säule vorhanden sind, sind Teile der Membran nicht verfügbar. Das führt dazu, dass die k_s -Werte, die mit einer ILC-Säule erhalten wurden, welche multilamellare Liposomen enthält, relativ kleiner. Daher sollen die immobilisierten Liposomen unilamellare Liposomen sein (Liu et al. 2001 und Liu et al. 2002).

4.2.8 Stabilität der immobilisierten Liposomen

Bezogen auf die unterschiedlichen Gelmatrizen und unterschiedlichen Methoden der Immobilisierung ist die Stabilität der ILC-Säulen auch unterschiedlich. Für die sterische Immobilisierung von EPC-Liposomen in Superdex 200 liegt der Verlust von Lipiden in 3 Wochen nach 100 Messungen bei 7% (Beigi et al. 1995). Der viel höhere Verlust von Lipiden tritt bei der sterische Immobilisierung von Liposomen in Sephacyl S-1000 und Sepharose 2B auf, der Verlust beträgt 17% nach 10 bis 13 Messungen (Yang et al. 1994). Die Säule mit den immobilisierten Liposomen durch Avidin-Biotin-Affinität hat eine bessere Stabilität. Nur 1% der Lipiden ging nach einmonatigen Messungen von 29 Arzneimitteln verloren (Liu et al. 2002).

Die Säulen mit den immobilisierten Liposomen blieben nicht immer unverändert, im Laufe der Zeit gab es immer mehr Verluste von Lipiden. Daher kann eine ILC-Säule nur eine gewisse Zeit verwendet werden.

Die Laufmittel für die chromatographische Elution sind normalerweise wässrige Puffer. Die Laufmittel, welche aus organischen Lösemitteln bestehen oder organische Lösemittel enthalten, sind immer schlecht für immobilisierte Liposomen und können die Säule drastisch beschädigen.

4.2.9 $\log K_s$ eines Arzneimittels bzw. dessen Absorption in menschlichem Körper

Es gibt eine nicht lineare Korrelation zwischen dem $\log K_s$ -Wert eines Arzneimittels und dessen Absorption in menschlichem Körper. Die Absorption eines Arzneimittels nimmt zu, wenn der $\log K_s$ -Wert sich im Wertintervall von 0 bis 1 erhöht. Wenn der $\log K_s$ -Wert eines Arzneimittels zwischen 1 und 3 liegt, erreicht die Absorption ein Sättigungsniveau; das heißt, dass die Absorption eines Arzneimittels, dessen $\log K_s$ -Wert größer als 1 und kleiner als 3 ist, fast komplett ist. (Beigi et al. 1995)

Falls der $\log K_s$ -Wert eines Arzneimittels zu klein ist, z.B. gegen 0, ist dies zu hydrophil für die Verteilung in Membrandoppelschichten. Umgekehrt, falls der $\log K_s$ -Wert eines Arzneimittels zu groß ist, z.B. größer als 3, dann ist es zu hydrophob, um sich weiter von der Membran diffundieren zu können. (Beigi et al. 1998)

Allerdings kann der $\log K_s$ -Wert eines Arzneimittels die Absorption vorhersagen, aber nur wenn das Arzneimittel transzellulär transportiert wird, nämlich durch passive Diffusion. Falls ein Arzneimittel parazellulär transportiert wird, was

häufig für die kleinen Moleküle (Molekülmasse < 200), wie Salicylsäure und Aspirin usw., der Fall ist, gibt der $\log k_s$ -Wert ein abweichendes Ergebnis. Die Absorption von Arzneimitteln, welche passiv oder aktiv durch Membranproteine transportiert werden, kann nicht durch die $\log k_s$ -Werte richtig vorhergesagt werden (Lundahl et al. 1997).

4.2.10 Korrelation zwischen $\log k_s$ -Wert und $\log k_{IAM}$, $\log D_{Lip}$, $\log P_{Okt}$ bzw. $\log D_{Okt}$

$\log k_{IAM}$, $\log D_{Lip}$, und $\log P_{Okt}$ bzw. $\log D_{Okt}$ sind auch Indizes, die für die Charakterisierung von Arzneimitteln und chemischen Verbindungen angewendet werden, z.B. hydrophobe Eigenschaft, passive Diffusion durch Membrane usw. Es gibt häufig lineare Korrelation zwischen $\log k_s$ und $\log k_{IAM}$, $\log D_{Lip}$, $\log P_{Okt}$ bzw. $\log D_{Okt}$. Die lineare Korrelation hängt auch von den zu untersuchenden Arzneimitteln bzw. chemischen Verbindungen ab. Für die ionisierbaren Arzneimittel ist die Korrelation zwischen deren $\log k_s$ -Werten und deren $\log D_{Okt}$ -Werten normalerweise besser als die Korrelation zwischen deren $\log k_s$ -Werten und deren $\log P_{Okt}$ -Werten (Beigi et al. 1995), und die Korrelationen zwischen $\log k_s$ -Werten und $\log k_{IAM}$ -Werten bzw. $\log D_{Lip}$ -Werten sind entweder moderat oder gut (Beigi et al. 1998 und Österberg et al. 2001).

5. Arzneimittel-Membran-Wechselwirkung gemessen mit ILC, und Vergleich von \log_{ILC} mit \log_{IAM} , $\log D_{lip}$, und $\log P_{Okt}$ bzw. $\log D_{Okt}$

Die Retentionen von 22 strukturell unterschiedlichen Substanzen und Arzneimitteln (Abb. 5.1 und Abb. 5.2) wurden mit ILC untersucht. Die Substanzen sind 4-Methylbenzylalkylamine (4-Methylbenzylmethylamin, 4-Methylbenzylethylamin, 4-Methylbenzylpropylamin, 4-Methylbenzylbutylamin, 4-Methylbenzylpentylamin, 4-Methylbenzylhexylamin, 4-Methylbenzylheptylamin) und Carbonsäure (3-Phenylpropionsäure, 3-Phenylvaleriansäure, 8-Phenyl-oktansäure), die Arzneimittel sind β -Blocker (Acebutolol, Alprenolol, Metoprolol, Oxprenolol, Propranolol, Penbutolol, Metipranolol) und nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR: Flurbiprofen, Indomethacin, Ketoprofen, Mefenaminsäure, Naproxen).

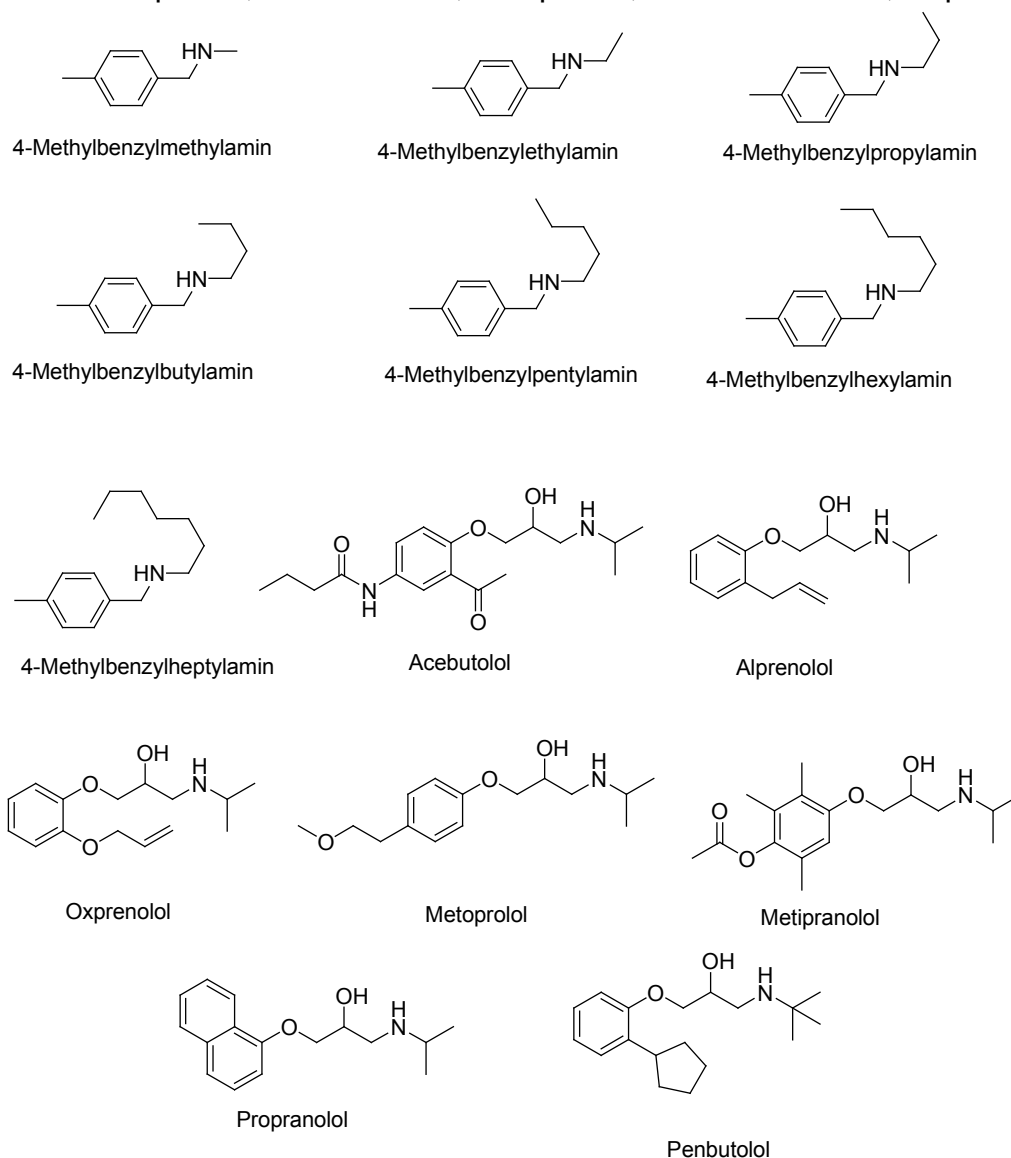
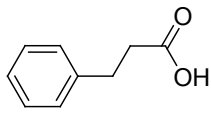
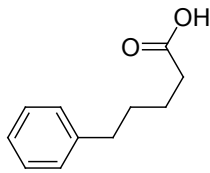


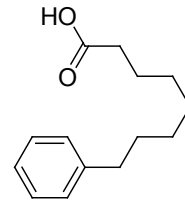
Abb. 5.1 Chemische Strukturen von (4-Methylbenzyl)alkylaminen und β -Blockern



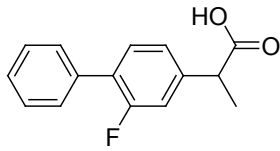
3-Phenylpropionsäure



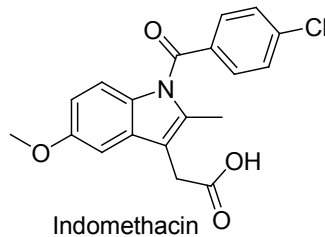
5-Phenylvaleriansäure



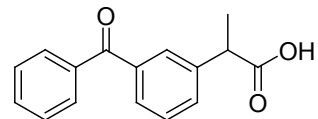
8-Phenylloktansäure



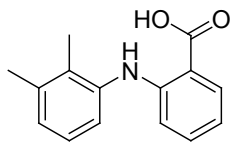
Flurbiprofen



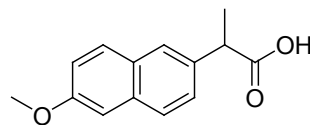
Indomethacin



Ketoprofen



Mefenaminsäure



Naproxen

Abb. 5.2 Chemische Strukturen von Carbonsäuren und NSAR

5.1 ILC-Säule

Das Säulenmaterial, das in dieser Untersuchung verwendet wurde, besteht aus Superdex 200 und darin immobilisierten EPC-Liposomen. Das Verhältnis zwischen Superdex und Liposomensuspension beträgt 110mg/1,5mL (100mM), wie im Abschnitt 4.2.3.1.2 beschrieben. Das Material wurde in eine HR5/5 Glassäule (Abb. 5.3) gepackt.



Abb. 5.3 ILC-Säule

5.2 Chromatographisches System und mobile Phase

Das chromatographische System besteht aus einem Merck® L-6200A-Pumpensystem und einem UV-Vis-Detektor L-4250 (Merck-Hitachi Ltd., Tokyo, Japan). Die mobile Phase war ein 10mM Tris/HCl Puffer mit 150 mM NaCl und 1mM Na₂EDTA, pH 7,4. Die Flussrate der mobilen Phase war 0,2 mL/min. Die Konzentration der Substanzlösung lag zwischen 10⁻⁴ und 10⁻³ M.

Die Messungen wurden in meiner Diplomarbeit schon durchgeführt. Zur Berechnung der spezifischen Kapazitätsfaktoren k_{ILC} (oder k_s) wurde die Gleichung 4-2 verwendet, die eventuelle Wechselwirkung zwischen den untersuchten Substanzen und dem Träger-Superdex 200 wurde vernachlässigt.

Die weitere Untersuchung von Korrelationen zwischen den $\log k_{ILC}$ -Werten und den $\log k_{IAM}$ -Werten, den $\log D_{Lip}$ -Werten, den $\log P_{Okt}$ -Werten bzw. den $\log D_{Okt}$ -Werten wurde dann in dieser Arbeit gemacht.

Zuerst wurde der Zusammenhang zwischen den spezifischen Retentionsfaktoren aus der ILC ($\log k_{ILC}$) und den Retentionsfaktoren aus dem IAM ($\log k_{IAM}$) untersucht. Weiter wurde der Zusammenhang zwischen den Retentionsfaktoren ($\log k_{ILC}$) und den Verteilungskoeffizienten aus dem Liposomen-Wasser-System ($\log D_{Lip}$) und dem 1-Oktanol-Wasser-System ($\log P_{Okt}$ bzw. $\log D_{Okt}$) untersucht.

Die Ergebnisse wurden in *Helvetica Chimica Acta* veröffentlicht (Liu et al. 2010).

5.3 Eigenschaften der untersuchten Substanzen

Die pKa-Werte von 4-Methylbenzylalkylaminen und β -Blockern liegen zwischen 9,50 und 10,20 (Taillardat-Bertschinger et al. 2002b), daher sind diese Verbindungen unter der Elutionsbedingung (pH 7,4) positiv geladen; Carbonsäure und NSAR (auch als NSAID bezeichnet: *non steroidal anti inflammatory drugs*) enthalten eine Carboxygruppe, welche unter der Elutionsbedingung die disassoziierte Form besitzt, und sind negativ geladen.

Die $\log k_{ILC}$ -Werte von allen Substanzen und deren $\log k_{IAM}$, $\log D_{Lip}$, $\log P_{Okt}$ bzw. $\log D_{Okt}$ sind in Tab. 5.1 gelistet.

Tab. 5.1 $\log k_{\text{ILC}}$ -, $\log k_{\text{IAM}}$ -, $\log D_{\text{Lip}}$ -, und $\log P_{\text{Okt}}$ - bzw. $\log D_{\text{Okt}}$ -Werte von den untersuchten Substanzen

Verbindung	$\log P_{\text{Okt}}^a$	$\log D_{\text{Okt}}^a$	$\log k_{\text{IAM}}^a$	$\log D_{\text{Lip}}^b$	$\log k_{\text{ILC}}$
4-MeC ₆ H ₄ CH ₂ NHMe	1,96	-0,97	0,96	2,54	0,95
4-MeC ₆ H ₄ CH ₂ NHEt	2,38	-0,44	1,02	2,26	0,96
4-MeC ₆ H ₄ CH ₂ NHPr	2,96	0,15	1,30	2,11	1,13
4-MeC ₆ H ₄ CH ₂ NHBu	3,49	0,67	1,87	1,55	1,41
4-MeC ₆ H ₄ CH ₂ NH(CH ₂) ₄ Me	4,26	1,32	2,27	1,86	1,85
4-MeC ₆ H ₄ CH ₂ NH(CH ₂) ₅ Me	4,96	1,91	2,77	2,45	2,34
4-MeC ₆ H ₄ CH ₂ NH(CH ₂) ₆ Me	5,12	2,21	2,92	2,73	2,88
Acebutolol	2,02	-0,20	1,57	1,93	0,88
Alprenolol	3,10	0,70	2,25	2,33	2,19
Metipranolol	2,81	0,38	1,78	2,27	1,81
Metoprolol	1,95	-0,54	1,45	1,59	1,02
Oxprenolol	2,51	0,21	1,70	2,09	1,48
Penbutolol	4,62	1,85	3,70	3,39	3,45
Propranolol	3,48	1,17	2,48	2,69	2,64
Ph(CH ₂) ₂ COOH	1,89	-0,59	-0,25		0,37
Ph(CH ₂) ₄ COOH	2,85	0,40	0,43		0,80
Ph(CH ₂) ₇ COOH	4,09	2,12	2,02		2,09
Flurbiprofen	3,81	0,72	1,78		2,08
Indomethacin	4,27	1,77	2,37		2,48
Ketoprofen	2,77	0,06	1,26		1,38
Mefenaminsäure	5,12	2,45	2,35		2,93
Naproxen	3,06	0,21	1,35		1,56

a: Daten aus Liu et al. 2008

b: Daten aus Taillardat-Bertschinger et al. 2002b

5.4 Vergleich der $\log k_{\text{ILC}}$ -Werte mit $\log D_{\text{Lip}}^{7,0}$ -Werten

Für die basischen Verbindungen, (4-Methylbenzyl)alkylamine und β -Blocker, deren $\log D_{\text{Lip}}^{7,0}$ -Werte verfügbar sind (Taillardat-Bertschinger et al. 2002b), wird die Korrelation zwischen deren $\log k_{\text{ILC}}$ - und deren $\log D_{\text{Lip}}^{7,0}$ -Werten in Abb. 5.4 gezeigt. Es wurde keine Korrelation zwischen den beiden Werten für die gesamten 14 Verbindungen gefunden. Aber eine gute Korrelation zwischen $\log k_{\text{ILC}}$ - und $\log D_{\text{Lip}}^{7,0}$ -Werten von β -Blockern besteht, die Korrelationsgleichung ist:

$$\log k_{\text{ILC}} = 1,52(\pm 0,38) \log D_{\text{Lip}}^{7,0} - 1,62(\pm 0,90) \quad (5-1)$$

Für die Korrelationsgleichung sind untere Parameter, nämlich die Zahl der Verbindungen (Parameter n), der Korrelationskoeffizient (Parameter r^2) und die Standardabweichung (Parameter s) wichtig. Für die Gleichung 5-1 ist n gleich 7, r^2 gleich 0,93 und s gleich 0,26.

Diese signifikante Korrelation bedeutet, dass sowohl die elektronischen als auch die hydrophoben Wechselwirkungen eine Rolle in der ILC-Säule mit immobilisierten EPC-Liposomen und in EPC-Liposomen/Wasser-System spielen. Die Retentionen der β -Blocker in der ILC-Säule und deren Verteilungen im EPC-Liposomen/Wasser wurden durch die gleiche Balance der intermolekularen Wechselwirkungen kontrolliert.

Es wurde keine Korrelation zwischen $\log k_{\text{ILC}}$ - und $\log D_{\text{Lip}}^{7,0}$ -Werten von (4-Methylbenzyl)alkylaminen beobachtet. Stattdessen war eine bilineare Beziehung zwischen den Werten zu sehen. Die lineare Beziehung zwischen $\log k_{\text{ILC}}$ - und $\log D_{\text{Lip}}^{7,0}$ -Werten von 4-Methylbenzylpentylamin, 4-Methylbenzylhexylamin und 4-Methylbenzylheptylamin hatte eine positive Steigung, dagegen hatte die lineare Beziehung bei 4-Methylbenzylmethylamin, 4-Methylbenzylethylamin und 4-Methylbenzylpropylamin eine negative Steigung. Das bedeutet, dass die elektrostatischen und die hydrophoben Wechselwirkungen eine unterschiedliche Rolle in der ILC und im Liposomen/Wasser-System spielen, nämlich dominieren nicht dieselben Bedeutungen der intermolekularen Wechselwirkungen in der ILC-Säule und im Liposomen/Wasser-System. Fruttero et al, (1998) haben darauf hingewiesen, dass die hydrophoben Wechselwirkungen die Verteilung von langkettigen Aminverbindungen (4-Methylbenzylpentylamin, 4-Methylbenzylhexylamin und 4-Methylbenzyl heptylamin) in Liposomen/Wasser-System dominieren; dagegen dominieren die elektrostatische Wechselwirkungen die Verteilung der kurzkettigen Aminverbindungen (4-Methylbenzylmethylamin, 4-Methylbenzylethylamin und 4-Methylbenzylpropylamin) im Liposomen/Wasser-System.

Die Ergebnisse aus der ILC zeigten jedoch, dass die elektrostatischen Wechselwirkungen eine kleinere Rolle in der ILC als im Liposomen/Wasser-System spielten. Dementsprechend war der Retentionsfaktor aus der ILC nicht austauschbar mit dem Verteilungskoeffizient aus dem Liposomen/Wasser-System für diese Aminverbindungen. Das tritt noch mehr auf für strukturell unverwandte Verbindungen zu.

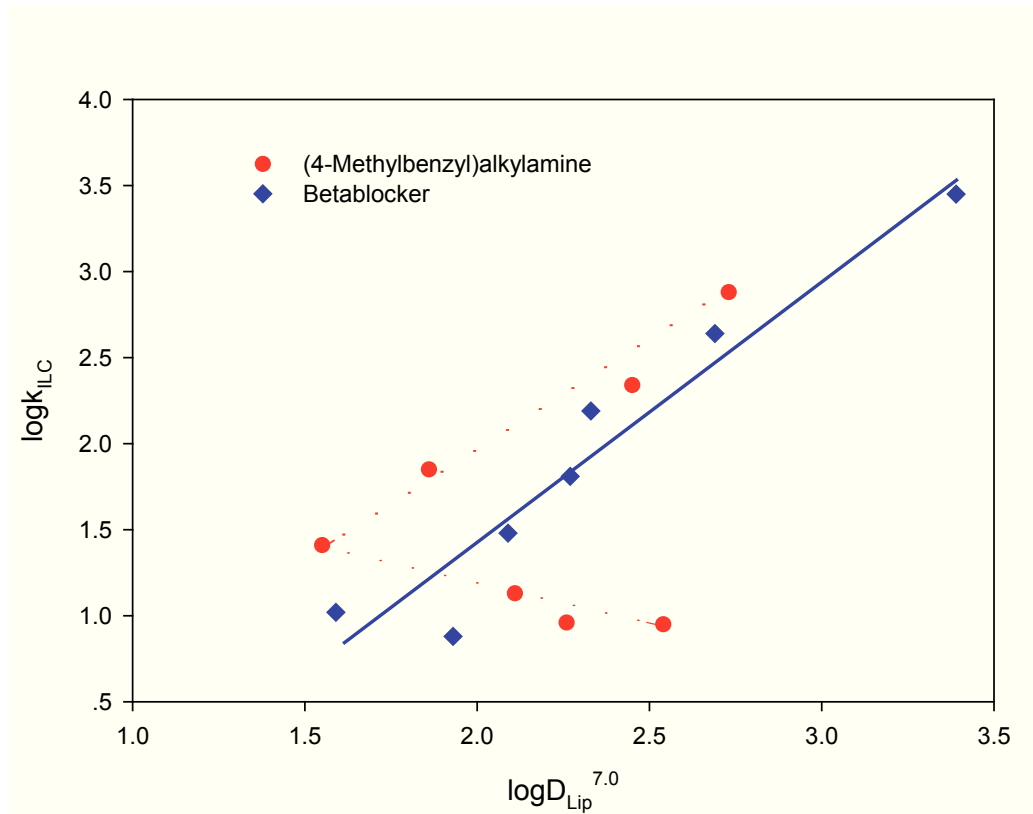


Abb. 5.4 Korrelationen zwischen den $\log k_{ILC}$ - und den $\log D_{Lip}^{7,0}$ -Werten von 14 basischen Verbindungen

5.5 Vergleich der $\log k_{ILC}$ -Werte mit $\log k_{IAM}^{7,0}$ -Werten

Eine Korrelation zwischen $\log k_{ILC}$ - und $\log k_{IAM}^{7,0}$ -Werten wurde bei keiner der 22 untersuchten Verbindungen beobachtet, das bedeutet, dass die beiden Systeme keine gleichwertigen Retentionsfaktoren für die strukturell unverwandte Verbindungen ergeben. Der mögliche Grund für den Unterschied zwischen den Retentionsfaktoren aus den beiden anisotropen chromatographischen Systemen könnte darin liegen, dass die Dichte der polaren Kopfgruppen unterschiedlich ist, welche ein wichtiger Faktor für die Verteilung der Verbindungen in biologischen oder artifiziellen Membranen ist. Allerdings sind signifikante Korrelationen zwischen $\log k_{ILC}$ - und $\log k_{IAM}^{7,0}$ -Werten für die basischen Verbindungen ((4-Methylbenzyl)alkylamine und β -Blocker) und für die sauren Verbindungen (Carbonsäuren und NSAR) separat zu sehen (Abb. 5.5).

Für die basischen Verbindungen gab es die folgende Korrelationsgleichung:

$$\log k_{ILC} = 0,98(\pm 0,16) \log k_{IAM}^{7,0} - 0,19(\pm 0,36) \quad (5-2)$$

Die Zahl der Verbindungen ist 14, der Korrelationskoeffizient r^2 ist 0,92 und die

Standardabweichung s ist 0,24.

Für die sauren Verbindungen gab es die Korrelationsgleichung 5-3:

$$\log k_{\text{ILC}} = 0,90(\pm 0,16) \log k_{\text{IAM}}^{7,0} + 0,44(\pm 0,28) \quad (5-3)$$

Die Zahl der Verbindungen ist 8, der Korrelationskoeffizient r^2 ist 0,95 und die Standardabweichung s ist 0,20.

Die signifikanten Korrelationen zwischen $\log k_{\text{ILC}}$ - und $\log k_{\text{IAM}}^{7,0}$ -Werten zeigen, dass elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen in ILC und IAM-Chromatographie für entweder die untersuchten, positiv geladenen basischen Verbindungen oder für die untersuchten, negativ geladenen sauren Verbindungen ähnlich waren. Mit anderen Worten, die Retentionsfaktoren aus der ILC war austauschbar mit den Retentionsfaktoren aus der IAM-Chromatographie für die strukturell verwandten Verbindungen. Für die untersuchten basischen Verbindungen war das ILC-System ähnlicher zu dem IAM-System als zu dem Liposomen/Wasser-System.

Die ähnlichen Steigungen und die unterschiedlichen Achsenabschnitte in den obigen zwei Gleichungen könnten eventuell durch die unterschiedlichen Bedeutungen der elektrostatischen Wechselwirkungen von verschiedenen Ionentypen in diesen beiden Membransystemen verursacht.

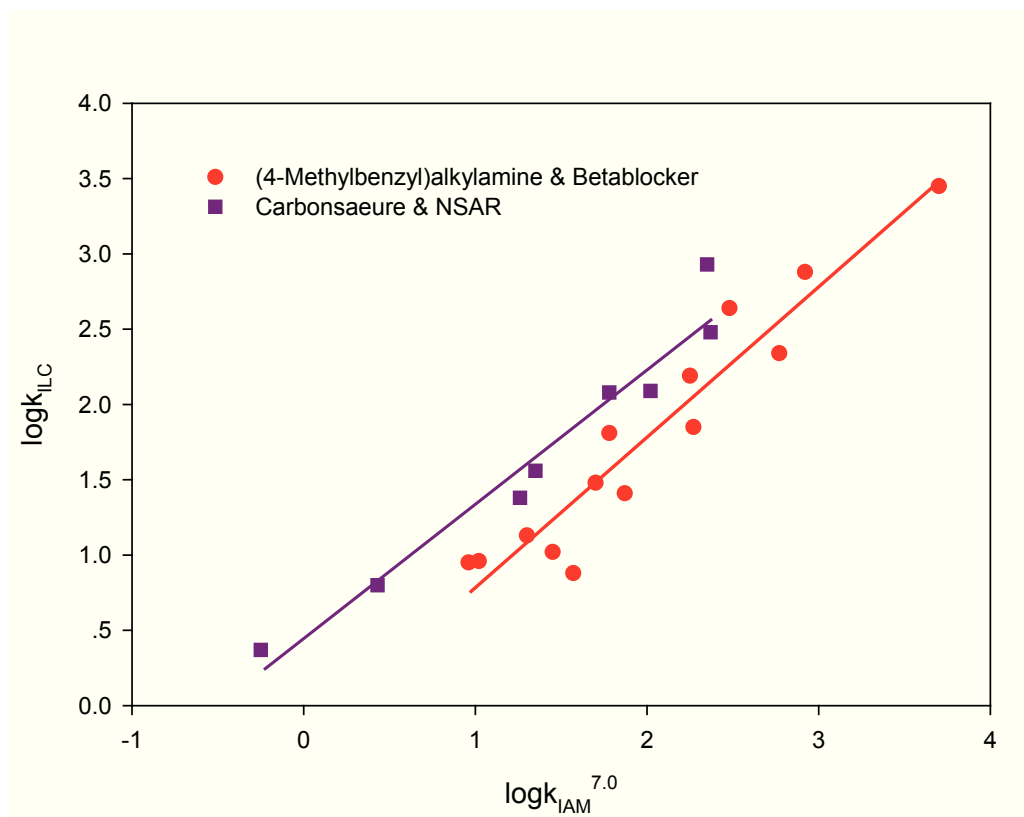


Abb. 5.5 Korrelationen zwischen den $\log k_{\text{ILC}}$ - und den $\log k_{\text{IAM}}^{7,0}$ -Werten von allen untersuchten Verbindungen

5.6 Vergleich der $\log k_{\text{ILC}}$ -Werte mit $\log P_{\text{Okt}}$ - bzw. $\log D_{\text{Okt}}^{7,0}$ -Werten

Der Vergleich von den $\log k_{\text{ILC}}$ -Werten mit den $\log P_{\text{Okt}}$ -Werten ist in Abb. 5.6a gezeigt, und zwar für alle 22 Verbindungen. Keine Korrelation existierte für die gesamten 22 Verbindungen, aber gute Korrelationen waren für das strukturell verwandte Set von (4-Methylbenzyl)alkylaminen, β -Blockern und Carbonsäuren bzw. NSAR ersichtlich.

Für (4-Methylbenzyl)alkylamine war die Korrelationsgleichung wie folgt:

$$\log k_{\text{ILC}} = 0,58(\pm 0,16) \log P_{\text{Okt}} - 0,42(\pm 0,58) \quad (5-4)$$

Die Zahl der Verbindungen ist 7, der Korrelationskoeffizient r^2 ist 0,92 und die Standardabweichung s ist 0,24.

Für β -Blocker gab es die Korrelationsgleichung 5-5:

$$\log k_{\text{ILC}} = 0,98(\pm 0,12) \log P_{\text{Okt}} - 0,94(\pm 0,36) \quad (5-5)$$

Die Zahl der Verbindungen ist 7, der Korrelationskoeffizient r^2 ist 0,98 und die Standardabweichung s ist 0,13.

Für Carbonsäuren und NSAR gab es die folgende Korrelationsgleichung:

$$\log k_{\text{ILC}} = 0,81(\pm 0,16) \log P_{\text{Okt}} - 1,10(\pm 0,60) \quad (5-6)$$

Die Zahl der Verbindungen ist 8, der Korrelationskoeffizient r^2 ist 0,94 und die Standardabweichung s ist 0,23.

Die gute Qualität der Korrelationsgleichung der (4-Methylbenzyl)alkylamine zeigt, dass für diese Aminverbindungen die intermolekularen Wechselwirkungen aufgrund der Retention in ILC vergleichbar mit den Wechselwirkungen im Oktanol/Wasser-System sind. Die signifikanten Korrelationen, welche in den obigen drei Gleichungen gezeigt sind, deuten an, dass die $\log k_{\text{ILC}}$ -Werte aus dem anisotropen ILC-System für die drei Sets von strukturell verwandten Verbindungen durch die traditionellen $\log P_{\text{Okt}}$ vorausgesagt werden könnten.

Es ist in Abb. 5.6(a) zu sehen, dass β -Blocker, welche unter der experimentalen Bedingung positiv geladen sind, am stärksten von den drei Sets der Verbindungen in der ILC-Säule zurückgehalten werden können. Die gleichen Ergebnisse wurden auch für IAM-Chromatographie gefunden (Taillardat-Bertschinger et al. 2002b). Das lässt darauf schließen, dass die Wechselwirkung von ionisierten Verbindungen mit immobilisierten Liposomen nicht nur von ihrem lipophilen Charakter, welcher als $\log P_{\text{Okt}}$ ausgedrückt ist, sondern auch von zusätzlichen Wechselwirkungen inklusive elektrostatischen Wechselwirkungen bzw. ihrer Fähigkeit, Wasserstoffbrückenbindungen mit den polaren Kopfgruppen der Phospholipide zu bilden, abhängig ist. β -Blocker können mehr Wasserstoffbrückenbindungen als (4-Methylbenzyl)alkylamine

bilden. Die Stärke von den zusätzlichen Wechselwirkungen ist von dem strukturellen Charakter der Verbindungen abhängig.

Der Vergleich von den $\log k_{\text{ILC}}$ -Werten mit den $\log D_{\text{Okt}}$ -Werten ist in Abb. 5.6b gezeigt, und zwar für alle 22 Verbindungen. Keine Korrelation existierte für die gesamten 22 Verbindungen, aber für das strukturell verwandte Set von (4-Methylbenzyl)alkylaminen, β -Blockern und Carbonsäuren bzw. NSAR gab es relativ guten Korrelationen.

Für (4-Methylbenzyl)alkylamine war die Korrelationsgleichung wie folgt:

$$\log k_{\text{ILC}} = 0,59(\pm 0,17) \log D_{\text{Okt}} + 1,23(\pm 0,22) \quad (5-7)$$

Die Zahl der Verbindungen ist 7, der Korrelationskoeffizient r^2 ist 0,91 und die Standardabweichung s ist 0,25.

Für β -Blocker gab es die Korrelationsgleichung 5-8:

$$\log k_{\text{ILC}} = 1,11(\pm 0,18) \log D_{\text{Okt}} + 1,36(\pm 0,16) \quad (5-8)$$

Die Zahl der Verbindungen ist 7, der Korrelationskoeffizient r^2 ist 0,97 und die Standardabweichung s ist 0,13.

Für Carbonsäuren und NSAR gab es die folgende Korrelationsgleichung:

$$\log k_{\text{ILC}} = 0,70(\pm 0,30) \log D_{\text{Okt}} + 1,09(\pm 0,40) \quad (5-9)$$

Die Zahl der Verbindungen ist 8, der Korrelationskoeffizient r^2 ist 0,79 und die Standardabweichung s ist 0,43.

Die Korrelationen zwischen $\log k_{\text{ILC}}$ -Werten und $\log D_{\text{Okt}}$ -Werten waren vergleichbar mit den Korrelationen zwischen $\log k_{\text{ILC}}$ -Werten und $\log P_{\text{Okt}}$ -Werten. Hier waren die ersteren nicht unbedingt besser als die letzteren.

5.7 Wechselwirkungen zwischen chemischen Verbindungen bzw. Arzneimitteln und Superdex

Die Wechselwirkungen zwischen einigen chemischen Verbindungen bzw. Arzneimitteln und Superdex wurden auch untersucht, damit der Einfluss auf die Wechselwirkung zwischen diesen Substanzen und Liposomen klar gemacht werden konnte. Dafür wurden zwei Säulen vorbereitet, wobei eine Säule nur aus Superdex 200 bestand, und die andere aus Supdex 200 und darin immobilisierten Liposomen bestand (ILC-Säule). Die Menge von Superdex in beiden Säulen war gleich.

Die Ergebnisse der Messungen sind in Tab. 5.2 und 5.3 gelistet und der Vergleich der beiden Ergebnisse ist in Tab. 5.4 zu sehen.

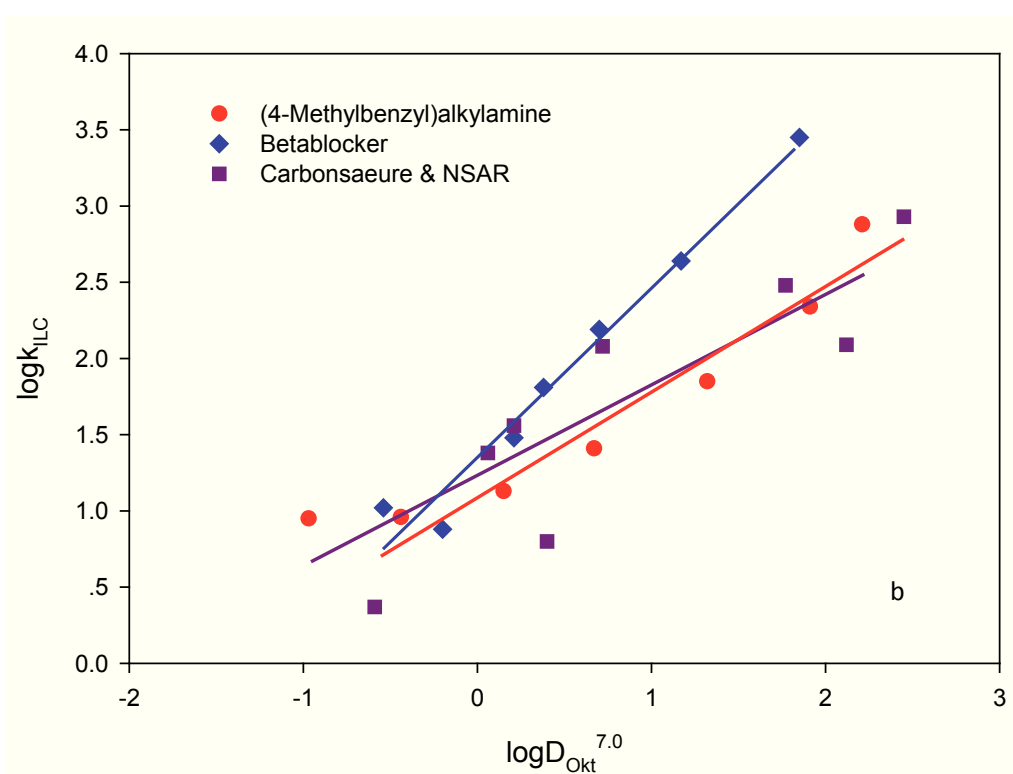
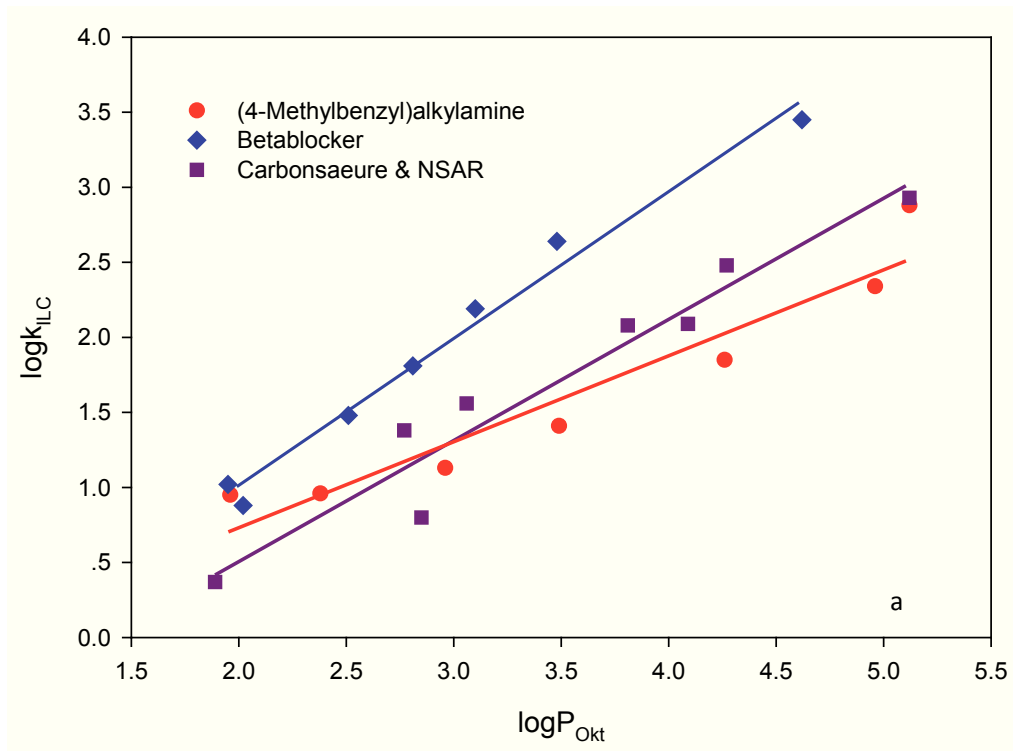


Abb. 5.6 Korrelationen zwischen den $\log k_{\text{ILC}}$ - und den $\log P_{\text{Okt}}^{7.0}$ -(a) bzw. den $\log D_{\text{Okt}}^{7.0}$ -Werten (b) von allen untersuchten Verbindungen

Tab. 5.2 Retentionen von chemischen Verbindungen und Arzneimitteln in einer mit Superdex gefüllten Säule (ohne Liposomen)

Probe	Retentionszeit t_{R1} min	Retentionszeit t_{R2} min	Mittelwert t_R min	Flußrate mL/min	Retentionsvolumen mL	$t_{Rohne}-t_0$	$V_{Rohne}-V_0$
$K_2Cr_2O_7$	3,48	3,40	3,44	0,30	1,03		
Penbutolol	3,48	3,48	3,48	0,30	1,04	0,04	0,01
Oxprenolol	3,62	3,68	3,65	0,30	1,10	0,21	0,06
Imipramin	5,97	5,92	5,95	0,30	1,78	2,51	0,75
Propranolol	5,66	5,69	5,68	0,30	1,70	2,24	0,67
Metoprolol	3,62	3,62	3,62	0,30	1,09	0,18	0,05
Metipranolol	3,79	3,78	3,79	0,30	1,14	0,35	0,10
Pindolol	5,00	4,99	5,00	0,30	1,50	1,56	0,47
Sulfamethazin	4,20	4,24	4,22	0,30	1,27	0,78	0,23
Sulfamethoxazol	3,79	3,83	3,81	0,30	1,14	0,37	0,11
Mefenaminsäure	8,88	8,91	8,90	0,30	2,67	5,46	1,64
Sulfabenzamid	4,28	4,26	4,27	0,30	1,28	0,83	0,25
Sulfanilamid	5,34	5,39	5,37	0,30	1,61	1,93	0,58
Sulfacetamid	3,58	3,54	3,56	0,30	1,07	0,12	0,04
Ibuprofen	3,66	3,61	3,64	0,30	1,09	0,20	0,06
4-Chlorobenzoessäure	3,71	3,70	3,71	0,30	1,11	0,27	0,08
Ketoprofen	3,88	4,02	3,95	0,30	1,19	0,51	0,15
4-Bromobenzoessäure	3,92	3,91	3,92	0,30	1,17	0,48	0,14
Theophyllin	3,74	3,73	3,74	0,30	1,12	0,30	0,09
Chloramphenicol	4,18	4,20	4,19	0,30	1,26	0,75	0,23
Verapamil	4,22	4,27	4,25	0,30	1,27	0,80	0,24
Diclofenac	6,56	6,52	6,54	0,30	1,96	3,10	0,93

Tab. 5.3 Retentionen von chemischen Verbindungen und Arzneimitteln in einer ILC-Säule (Superdex mit Liposomen)

Probe	Retentionszeit t_{R1} min	Retentionszeit t_{R2} min	Mittelwert t_R min	Flußrate mL/min	Retentionsvolumen mL	$t_{Rmit}-t_0$	$V_{Rmit}-V_0$
$K_2Cr_2O_7$	3,26	3,27	3,27	0,30	0,98		
Penbutolol	22,08	20,95	21,52	0,30	6,45	18,25	5,48
Oxprenolol	3,94	3,93	3,94	0,30	1,18	0,67	0,20
Imipramin	13,50	13,51	13,51	0,30	4,05	10,24	3,07
Propranolol	10,91	11,07	10,99	0,30	3,30	7,73	2,32
Metoprolol	3,38	3,38	3,38	0,30	1,01	0,12	0,03
Metipranolol	4,2	4,2	4,20	0,30	1,26	0,94	0,28
Pindolol	4,84	4,83	4,84	0,30	1,45	1,57	0,47
Sulfamethazin	4,02	4,10	4,06	0,30	1,22	0,80	0,24
Sulfamethoxazol	3,72	3,72	3,72	0,30	1,12	0,46	0,14
Mefenaminsäure	15,06	14,7	14,88	0,30	4,46	11,62	3,48
Sulfabenzamid	4,08	4,08	4,08	0,30	1,22	0,82	0,24
Sulfanilamid	5,10	5,08	5,09	0,30	1,53	1,83	0,55
Sulfacetamid	3,35	3,42	3,39	0,30	1,02	0,12	0,04
Ibuprofen	3,84	3,85	3,85	0,30	1,15	0,58	0,17
4-Chlorbenzoesäure	3,66	3,68	3,67	0,30	1,10	0,41	0,12
Ketoprofen	3,74	3,76	3,75	0,30	1,13	0,49	0,15
4-Brombenzoesäure	3,85	3,85	3,85	0,30	1,16	0,59	0,18
Theophyllin	3,53	3,53	3,53	0,30	1,06	0,27	0,08
Chloramphenicol	5,14	5,19	5,17	0,30	1,55	1,90	0,57
Verapamil	5,48	5,48	5,48	0,30	1,64	2,22	0,66
Diclofenac	13,43	12,98	13,21	0,30	3,96	9,94	2,98

Tab. 5.4 Vergleich des Retentionsvolumens aus Tab. 5.2 und 5.3

Probe	$V_{\text{Rmit}}^* - V_0$	$V_{\text{Rohne}}^{\#} - V_0$
$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$		
Penbutolol	5,48	0,01
Oxprenolol	0,20	0,06
Imipramin	3,07	0,75
Propranolol	2,32	0,67
Metoprolol	0,03	0,05
Metipranolol	0,28	0,10
Pindolol	0,47	0,47
Acridin	7,86	4,24
Sulfamethazin	0,24	0,23
Sulfamethoxazol	0,14	0,11
Mefenaminsäure	3,48	1,64
Sulfabenzamid	0,24	0,25
Sulfanilamid	0,55	0,58
Sulfacetamid	0,04	0,04
Ibuprofen	0,17	0,06
4-Chlorobenzoessäure	0,12	0,08
Ketoprofen	0,15	0,15
4-Bromobenzoessäure	0,18	0,14
Theophyllin	0,08	0,09
Chloramphenicol	0,57	0,23
Verapamil	0,66	0,24
Diclofenac	2,98	0,93

*: Superdex 200 mit Liposomen

#: nur Superdex 200 und ohne Liposomen

Der Einfluss der Wechselwirkung zwischen chemischen Verbindungen bzw. Arzneimitteln und Superdex auf die Wechselwirkung zwischen diesen Substanzen und Liposomen war von der Substanz abhängig (Abb. 5.7). Manche Substanzen hatten schwache oder sehr schwache Wechselwirkung mit Superdex, z.B. Penbutolol und Imipramin, manche hatten starke Wechselwirkung mit Superdex. Die $V_{\text{Rohne}} - V_0$ -Werte von einigen Substanzen waren fast gleich mit deren $V_{\text{Rmit}} - V_0$ -Werten oder sogar größer als deren $V_{\text{Rmit}} - V_0$ -Werte.

ILC kann zur Untersuchung von Arzneimitteln verwendet werden, aber es muss auf den Einfluss der Wechselwirkung zwischen Substanz und Superdex geachtet werden.

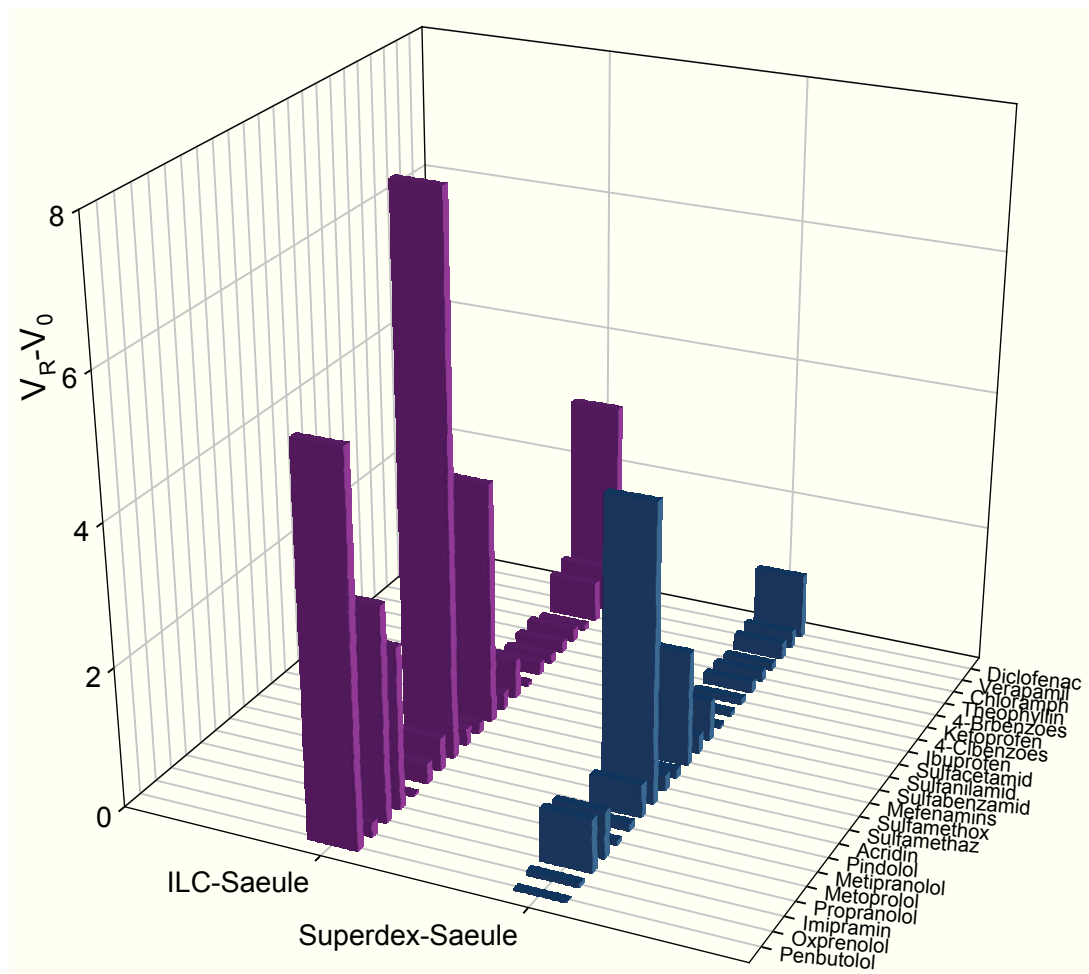


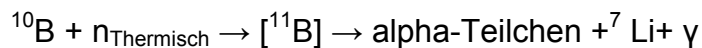
Abb. 5.7 Vergleich von $V_{Rmit}^* - V_0$ mit $V_{Rohne}^{\#} - V_0$ (Daten aus Tab. 5.4)

6. Untersuchung von Borclusterverbindungen mit ILC

Ein großer Teil der Arbeit wurde auf die Untersuchung der Wechselwirkung zwischen Borclusterverbindungen (Dodecaborat-Cluster-Verbindungen) und Liposomen konzentriert, weil Borclusterverbindungen für Bor-Neutroneneinfangtherapie eingesetzt werden, und weil darüber hinaus diese Art von Verbindungen Potential für medizinische Anwendung gezeigt haben, Beispiel ist die Aggregation und die Leckage der Liposomen beim Inkubieren mit BSH.

6.1 Bor-Neutroneneinfangtherapie (Boron Neutron Capture Therapy : BNCT)

Bor-Neutroneneinfangtherapie ist eine relativ neue Behandlungstherapie von Tumoren, und basiert auf die nuklearen Reaktionen zwischen ^{10}B -Kernen und thermischen Neutronen. Wenn das stabile Isotop ^{10}B mit einem Neutron, welches eine angemessene Energie hat, bestrahlt wird, kommt ^{11}B zustande, welches aber in diesem Fall sehr instabil ist, und innerhalb von 10^{-12} Sekunden in ein α -Teilchen und ein ^7Li -Kern zerfällt.



Die Energie, die durch Kernspaltung erzeugt wird, beträgt 2,31 MeV und wird auf die Teilchen verteilt wie in Abb. 6.1 dargestellt. Die schwereren Kernteilchen, nämlich α -Teilchen und ein ^7Li -Kern, haben Reichweiten von ungefähr einem Zelldurchmesser (5-9 μm) und in dieser Reichweite geben die Teilchen ihre Energie ab, dadurch wird die Tumorzelle abgetötet (Barth 2003 und Barth et al. 2005).

Die Voraussetzung für BNCT ist die Anreicherung von ^{10}B in Tumorzellen, mit anderen Worten sollte eine ausreichende Menge von ^{10}B -Atomen in einer Tumorzelle gewährleistet werden, damit der Einfangquerschnitt von ^{10}B den Einfangquerschnitt von anderen Atomen, z.B. Stickstoff, überschreiten kann. Stickstoff hat einen Einfangquerschnitt von 1,83 barn ($1 \text{ barn} = 10^{-24} \text{ cm}^2$) und die Häufigkeit von Stickstoff im Hautgewebe beträgt 0,042 g/g. Im Vergleich dazu hat ^{10}B einen Einfangquerschnitt von 3838 barn, daher sind mehr als 20 $\mu\text{g } ^{10}\text{B} / \text{g Tumorgewebe}$ oder $10^9 \text{ } ^{10}\text{B}\text{-Atome} / \text{Tumorzelle}$ notwendig (Gabel 1997 und Koryakin 2006).

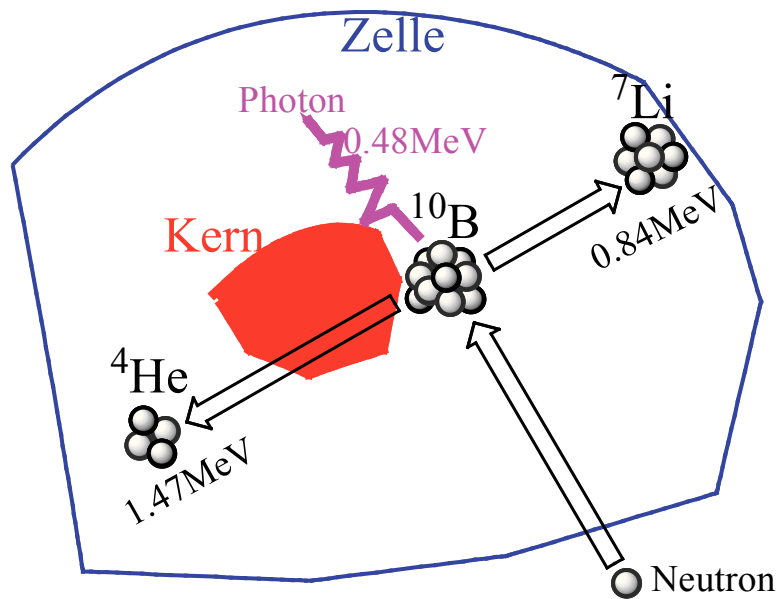


Abb. 6.1 Schematische Darstellung der Bor-Neutroneneinfangtherapie

6.2 Wechselwirkung zwischen BSH ($\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}$) und Liposomen aus Phosphatidylcholin

Während der Untersuchung des Einflusses von BSH auf Membranen aus Phosphatidylcholin wurde gefunden, dass BSH die Aggregation und die Leckage von Liposomen induzieren kann (Awad et al. 2009 und Gabel et al. 2007). Wenn Liposomen mit BSH inkubiert wurden, wurde die Aggregation vom BSH angetrieben, und große Aggregate wurden gebildet (Abb. 6.2).

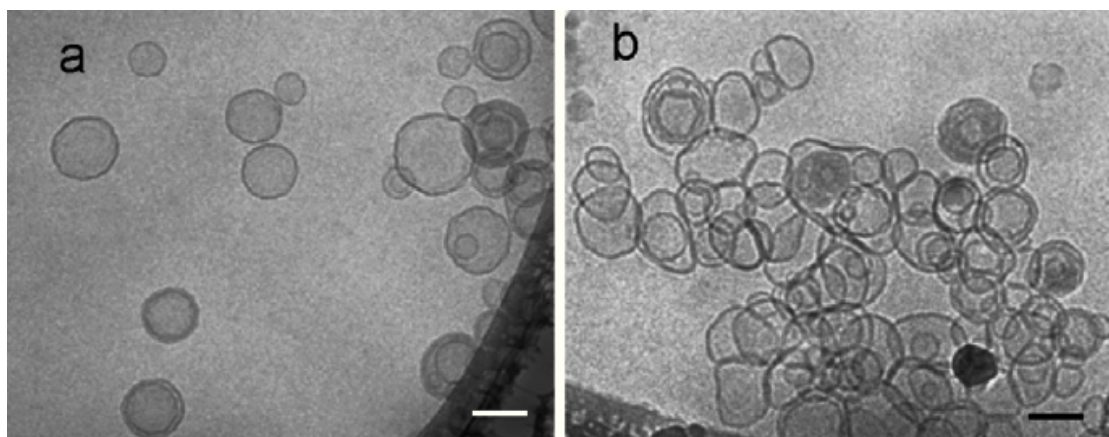


Abb. 6.2 Aggregationsstruktur von Liposomen aus DMPC inkubiert (a) ohne BSH und (b) mit 0,2mM BSH (Awad et al. 2009)

Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass Borclusterverbindungen mit den Kopfgruppen der Phospholipide wechselwirken können. Das Zetapotenzial von Liposomen nahm mit erhöhender BSH-Konzentration ab, was bedeutet, dass es starke Assoziation zwischen BSH und Liposomen gab. (Awad et al. 2009)

Dieser Befund ist interessant und könnte die Basis für die zukünftige pharmazeutische und medizinische Verwendung von Borclusterverbindungen sein. Die Wechselwirkungen zwischen diesen Verbindungen und Liposomen sollten aber noch genauer untersucht werden, dafür kommen die chromatographischen Methoden in Frage.

6.3 Borclusterverbindungen (Dodecaborat-Cluster-Verbindungen)

Es werden unterschiedliche Borclusterverbindungen untersucht. Es gibt Dodecahydrododecaborat ($\text{Na}_2\text{B}_{12}\text{H}_{12}$) und dessen Derivat $\text{Na}_2\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{PhCH}_3$, schwefelhaltige bzw. stickstoffhaltige Borcluster-Verbindungen und halogenierte Clusterverbindungen. Alle Borclusterverbindungen und deren Name bzw. Ladung sind in Tab. 6.1 gelistet. Die Strukturen sind in Abb. 6.3 zu sehen.

Die Borclusterverbindungen sind ikosaederische Substanzen mit 12 Boratomen. Die 12 Boratome besetzen die 12 Ecken des Clusters und der unsubstituierte Cluster enthält zwei negative Ladungen.

Tab. 6.1 Borclusterverbindungen und deren Ladung bzw. Name

Verbindung	Abkürz.	Lad.	Name
$\text{B}_{12}\text{H}_{12}$	$\text{B}_{12}\text{H}_{12}$	2-	Dodecahydrododecaborat
$\text{B}_{12}\text{Cl}_{12}$	$\text{B}_{12}\text{Cl}_{12}$	2-	Dodecachlorododecaborat
$\text{B}_{12}\text{Br}_{12}$	$\text{B}_{12}\text{Br}_{12}$	2-	Dodecabromododecaborat
$\text{B}_{12}\text{I}_{12}$	$\text{B}_{12}\text{I}_{12}$	2-	Dodecaiiodododecaborat
$\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{NH}_3$	BNH_3	1-	Ammoniumundecahydrododecaborat
$\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{NMe}_3$	BNMe_3	1-	<i>N,N,N</i> -Trimethylammoniumundecahydrododecaborat
$\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{NEt}_3$	BNEt_3	1-	<i>N,N,N</i> -Triethylammoniumundecahydrododecaborat
$\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{NPr}_3$	BNPr_3	1-	<i>N,N,N</i> -Tripropylammoniumundecahydrododecaborat
$\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{NBzH}_2$	BNBzH_2	1-	<i>N</i> -Benzyl-ammoniumundecahydrododecaborat
$\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{NBzEt}_2$	BNBzEt_2	1-	<i>N</i> -Benzyl- <i>N,N</i> -diethylammoniumundecahydrododecaborat
$\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}$	BSH	2-	Mercaptoundecahydrododecaborat
$\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SMe}_2$	BSMe_2	1-	<i>S,S</i> -Dimethylsulfoniumundecahydrododecaborat
$\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{C}_6\text{H}_4\text{Me}$	$\text{BC}_6\text{H}_4\text{Me}$	1-	<i>p</i> -Tolylundecahydrododecaborat

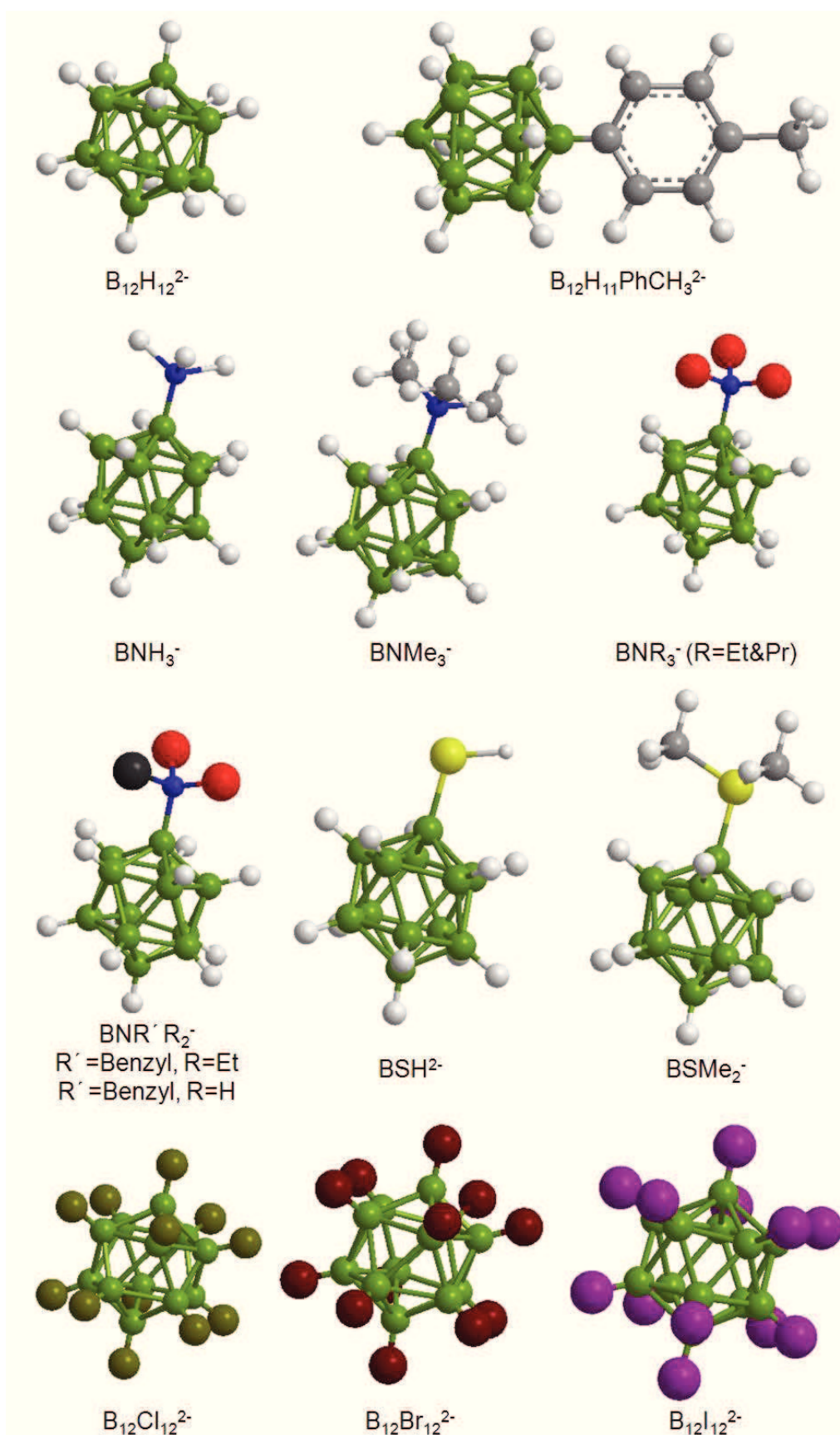


Abb. 6.3 Strukturen der Borclusterverbindungen

6.4 Retention der Borclusterverbindungen gemessen mit ILC

Die Retentionszeiten von folgenden Clusterverbindungen, $B_{12}H_{12}^{2-}$, BSH^{2-} , BNH_3^- , $BNMe_3^-$ und $BNEt_3^-$, wurden mit ILC gemessen. Das gepackte Säulenmaterial war identisch mit dem in Abschnitt 5.1 beschrieben.

Das chromatographische System ist ein HPLC-System Series 1100 (Agilent, Germany) mit zwei Gradientenpumpen, einem online-Entgaser, einem Autosampler und einem Bruker Esquire ESI-MS Ionenfallendetektor (Bruker, Germany).

Die mobile Phase war ein 10 mM Tris/HCl Puffer mit 150 mM NaCl und 1 mM Na_2EDTA , pH 7,4. Die Ergebnisse sind in Tab. 6.2 gelistet.



Abb. 6.4 Das chromatographische System

Eine Säule, in der DPPC-Liposomen in Superdex 200 immobilisiert wurden, wurde auch zur Untersuchung verwendet und die Ergebnisse waren ähnlich wie die in Tab. 6.2 gelistet. Abb. 6.5 zeigt die Chromatogramme von BNH_3^- , $BNMe_3^-$ und $BNEt_3^-$.

Tab. 6.2 Retentionszeiten und Retentionsvolumina von $B_{12}H_{12}^{2-}$, BSH^{2-} , BNH_3^- , $BNMe_3^-$ und $BNEt_3^-$ bei drei unterschiedlichen Temperaturen gemessen mit einer EPC-haltigen ILC-Säule

Probe	Retentionszeit t_{R1} min	Retentionszeit t_{R2} min	Mittelwert t_R min	Flußrate mL/min	Retentionsvolumen mL	283K
$K_2Cr_2O_7$	4,35	4,50	4,43	0,20	0,89	
$B_{12}H_{12}$	12,70	11,50	12,10	0,20	2,42	
BSH	18,80	15,00	16,90	0,20	3,38	
BNH_3	34,20	29,80	32,00	0,20	6,40	
$BNMe_3$	43,70	38,00	40,85	0,20	8,17	
$BNEt_3$	95,30	95,30	95,30	0,20	19,06	
Probe	Retentionszeit t_{R1} min	Retentionszeit t_{R2} min	Mittelwert t_R min	Flußrate mL/min	Retentionsvolumen mL	RT
$K_2Cr_2O_7$	4,40	4,30	4,35	0,20	0,87	
$B_{12}H_{12}$	6,90	6,90	6,90	0,20	1,38	
BSH	8,70	8,60	8,65	0,20	1,73	
BNH_3	13,90	14,00	13,95	0,20	2,79	
$BNMe_3$	19,30	19,40	19,35	0,20	3,87	
$BNEt_3$	44,90	44,90	44,90	0,20	8,98	
Probe	Retentionszeit t_{R1} min	Retentionszeit t_{R2} min	Mittelwert t_R min	Flußrate mL/min	Retentionsvolumen mL	310K
$K_2Cr_2O_7$	4,20	4,30	4,25	0,20	0,85	
$B_{12}H_{12}$	6,10	6,10	6,10	0,20	1,22	
BSH	7,40	7,60	7,50	0,20	1,50	
BNH_3	10,80	11,40	11,10	0,20	2,22	
$BNMe_3$	15,60	15,30	15,45	0,20	3,09	
$BNEt_3$	35,50	35,50	35,50	0,20	7,10	

6.5 Untersuchung des Einflusses von Superdex 200 auf die Retention

Die Retention der Borclusterverbindungen sollte nur auf die Wechselwirkung zwischen diesen Verbindungen und Liposomen zurückzuführen sein. Um dies zu bestimmen, wurde die Elution von diesen Verbindungen auch mit einer

Säule, in der nur Superdex 200 gepackt wurde, untersucht. Damit wurde der Einfluss von Superdex 200 auf die Retention festgestellt. Das chromatographische System und andere experimentale Bedingungen waren wie in Abschnitt 6.4 beschrieben.

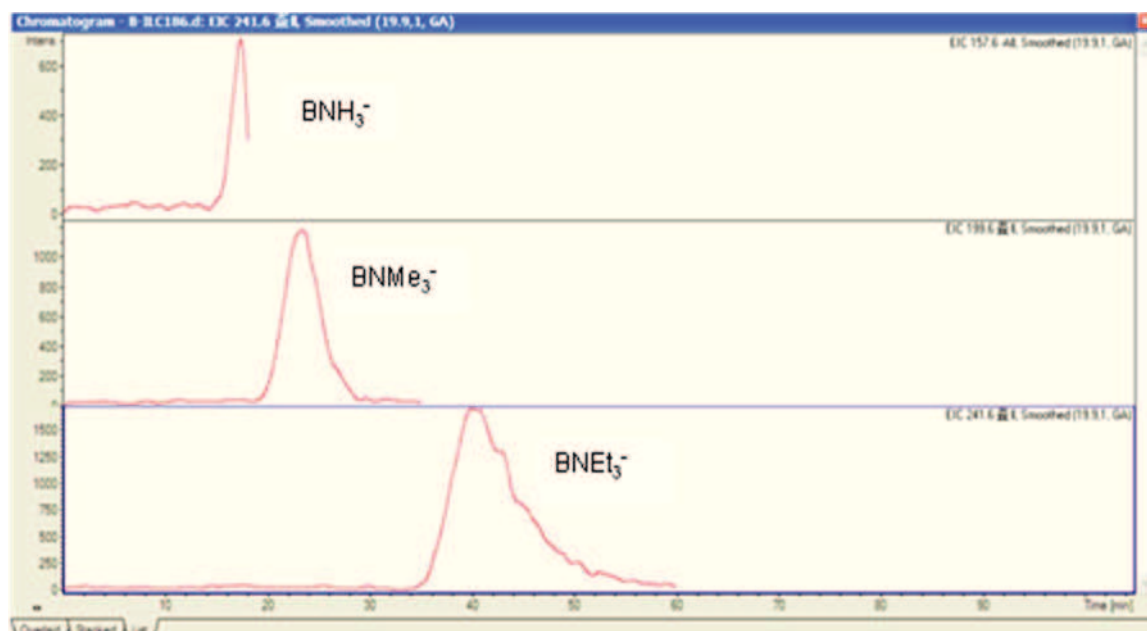


Abb. 6.5 Chromatogramme von BNH_3^- , BNMe_3^- und BNEt_3^- . Das Säulenmaterial bestand aus Superdex 200 und darin immobilisierten DPPC-Liposomen.

Die Retentionszeiten und Retentionsvolumina von $\text{B}_{12}\text{H}_{12}^{2-}$, BSH^{2-} , BNH_3^- , BNMe_3^- und BNEt_3^- bei Raumtemperatur sind in Tab. 6.3 gelistet.

Abb. 6.6 zeigt die Chromatogramme von BNH_3^- , BNMe_3^- und BNEt_3^- .

Tab. 6.3 Retentionszeiten und Retentionsvolumina von $\text{B}_{12}\text{H}_{12}^{2-}$, BSH^{2-} , BNH_3^- , BNMe_3^- und BNEt_3^- bei RT mit einer Superdex-Säule

Probe	Retentionszeit t_{R1} min	Retentionszeit t_{R2} min	Mittelwert t_R min	Flußrate mL/min	Retentionsvolumen mL	RT
$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	4,50	4,50	4,50	0,20	0,90	
$\text{B}_{12}\text{H}_{12}$	5,30	5,30	5,30	0,20	1,06	
BSH	6,20	9,40	7,80	0,20	1,56	
BNH_3	14,50	15,80	15,15	0,20	3,03	
BNMe_3	19,00	20,30	19,65	0,20	3,93	
BNEt_3	31,70	35,70	33,70	0,20	6,74	

Wenn die Ergebnisse in Tab. 6.3 mit denen in Tab. 6.2 bei RT verglichen werden, ist es zu sehen, dass es keinen großen Unterschied gibt. Das bedeutet, dass diese Borclusterverbindungen mit Superdex 200 stark wechselwirken können.

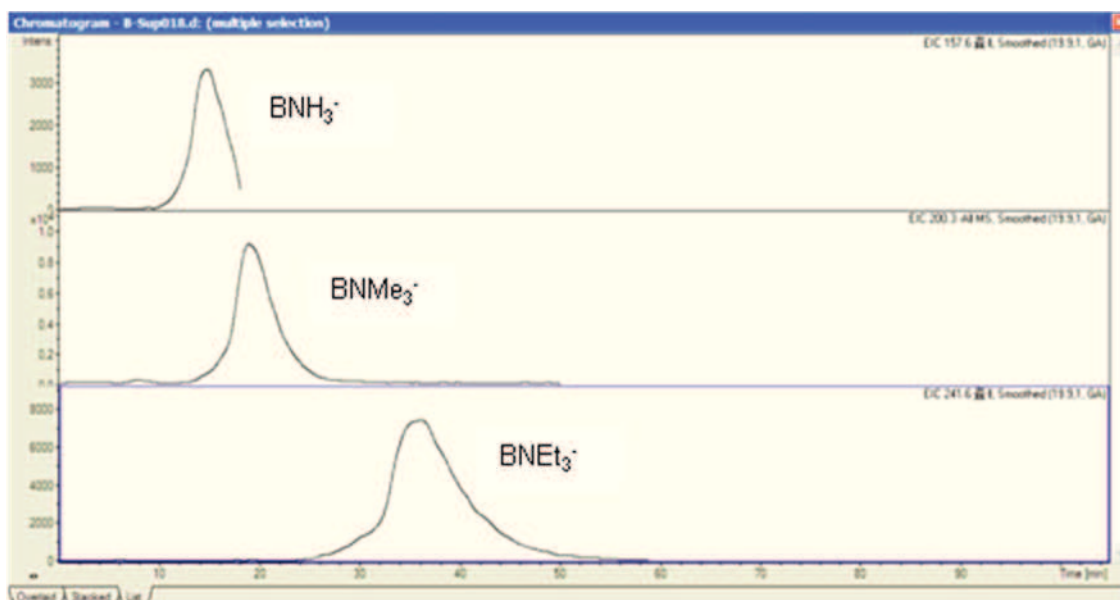


Abb. 6.6 Chromatogramme von BNH_3^- , BNMe_3^- und BNEt_3^- . Säulenmaterial ohne DPPC-Liposomen

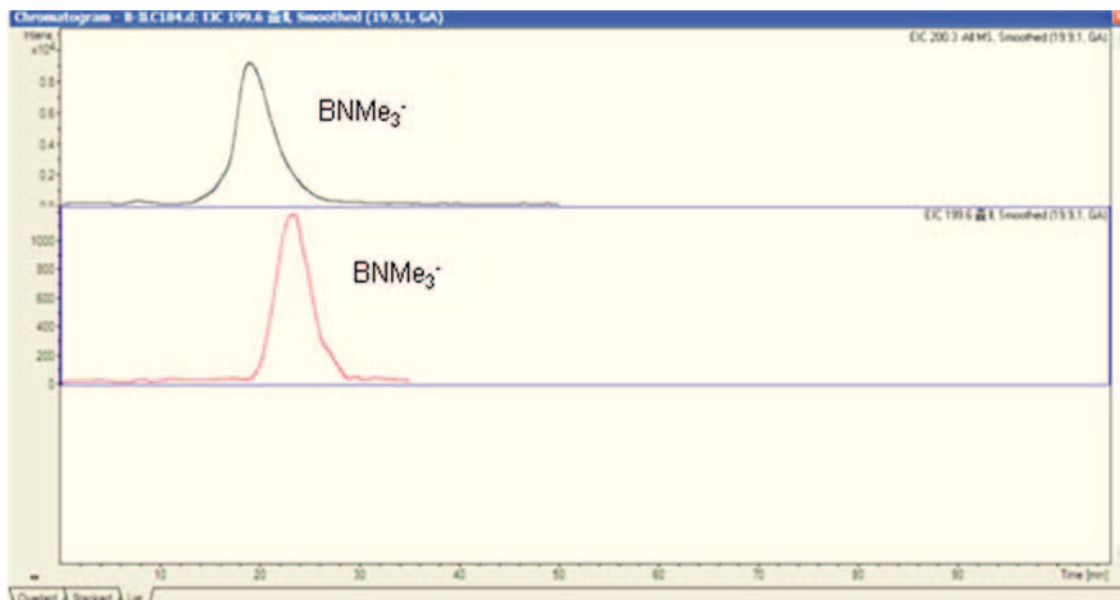


Abb. 6.7 Vergleich der Chromatogramme von BNMe_3^- . Rot: mit DPPC

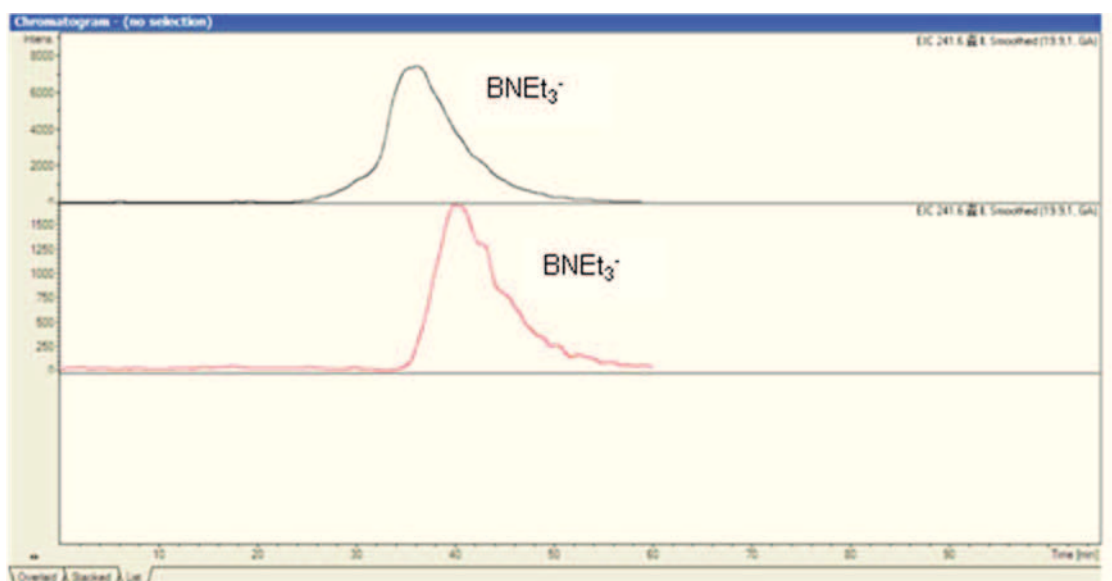


Abb. 6.8 Vergleich der Chromatogramme von BNEt_3^- . Rot: mit DPPC

Die Vergleiche der Chromatogramme von BNMe_3^- und BNEt_3^- , die mit einer DPPC-Liposomen-haltigen Säule (ILC-Säule) und mit einer liposomenfreien Säule (Superdex-Säule) gemessen sind, sind in Abb. 6.7 und Abb. 6.8 zu sehen. Die Retentionszeit von BNMe_3^- in der ILC-Säule beträgt 19,5 min und die Retentionszeit in der Superdex-Säule beträgt 21,0 min; die Retentionszeit von BNEt_3^- in der ILC-Säule beträgt 36,0 min und diese Retentionszeit in der Superdex-Säule beträgt 40 min. Im Vergleich zu deren Retentionszeit ist der Unterschied der Retention in diesen zwei Säulen klein, nämlich beträgt der Unterschied 7%-10% der Retentionszeit. Das heißt, dass diese Borclusterverbindungen mit Superdex stark in Wechselwirkung treten können, und dadurch werden die wirklichen Wechselwirkungen von Borclusterverbindungen mit Liposomen erheblich verfälscht. Von daher kann ILC zur Untersuchung von Borclusterverbindungen nicht verwendet werden. Als nächstes wurde die Wechselwirkung von Borclusterverbindungen mit einigen Gelmatrizen untersucht, damit eine bessere Matrix für ILC gefunden und eingesetzt oder für die Entwicklung anderer Methoden verwendet werden kann.

7. Wechselwirkung von Dodecaborat-Cluster-Verbindungen mit hydrophilen Säulenmaterialien

7.1 Hydrophile Säulenmaterialien

Die hydrophilen Säulenmaterialien (auch als Säulenmatrizen, Gelmaterialien oder Gelmatrizen bezeichnet), welche für die Untersuchungen gewählt wurden, sind Superdex 200, Sepharose 4B, Sephadex G-50, Sephadex G-100, Silicagel und Alumina. Sie sind Materialien, die entweder für Gelfiltration und ILC oder für Normale-Phase-Chromatographie (Silicagel und Alumina) verwendet werden.

7.1.1 Superdex

Superdex basiert auf hoch quervernetzter poröser Agarose, wobei Dextran kovalent gebunden wird (Abb. 7.1). Dieses Material hat eine enge verteilung der Partikelgröße (durchschnittlicher Durchmesser: 34 μm).

Die Agarosematrix verleiht Superdex die hohe physikalische und chemische Stabilität und die Dextranketten sind entscheidend für die Eigenschaften der Gelfiltration. Daher ermöglicht Superdex hohe Auflösung bei hoher Flussrate.

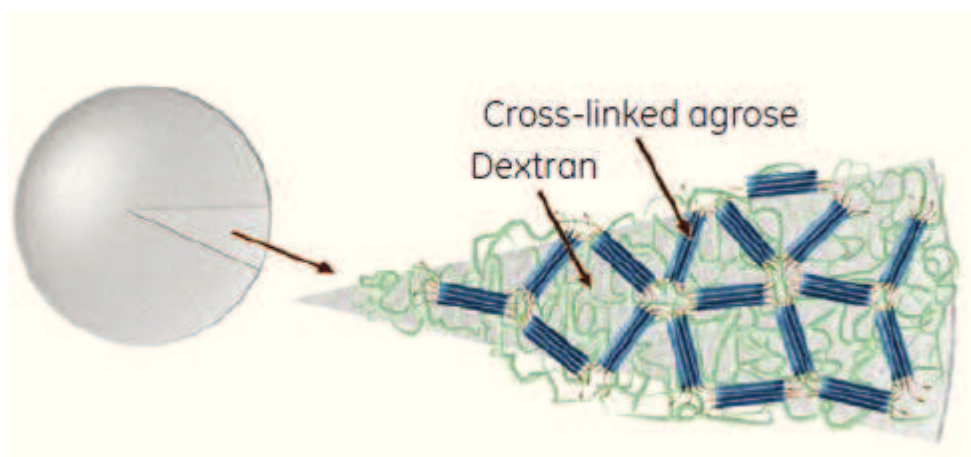


Abb. 7.1 Struktur von Superdex. Die Dextranketten sind kovalent an die hoch quervernetzte Agarosematrix gebunden. (Bild aus Produktinfo von GE Healthcare)

7.1.2 Sepharose

Sepharose ist ein aus Agarose vorbereitetes Gelmaterial (Tab. 7.1). Das Gel bildet sich, wenn eine heiße Lösung von Agarose abgekühlt ist. Dabei bilden

die individuellen Polysaccharidketten, welche aus sich wiederholenden Bauteilen bestehen, zuerst Doppelhelices. Die Aggregation von den Doppelhelices lässt die Bündel bzw. die Bildung eines stabilen Gels zustande kommen (Abb. 7.2 und Abb. 7.3).

Die Struktur von Sepharose ist durch Wasserstoffbrückenbindung und nicht durch kovalente Quervernetzung stabilisiert. Es ist stabil in wässrigen und salzhaltigen Lösungen bei einem pH von 4-9 und Abwesenheit von Oxidationsstoffen. Bei Temperaturen höher als 40 °C fängt das Gel an zu schmelzen und die Struktur könnte irreversibel beim Erstarren beschädigt werden.

Tab. 7.1 Eigenschaften von Sepharose (Gel filtration: Principles and Methods, amersham pharmacia biotech)

Geltyp	ungefähr. %	Partikelgröße µm	Fraktionierungsbereich	
	Agarose		globulare Proteine	Dextran
Sepharose 6B	6	45-165	$1 \times 10^4 - 4 \times 10^6$	$1 \times 10^4 - 1 \times 10^6$
Sepharose 4B	4	45-165	$6 \times 10^4 - 2 \times 10^7$	$3 \times 10^4 - 5 \times 10^6$
Sepharose 2B	2	60-200	$7 \times 10^4 - 4 \times 10^7$	$1 \times 10^5 - 2 \times 10^7$

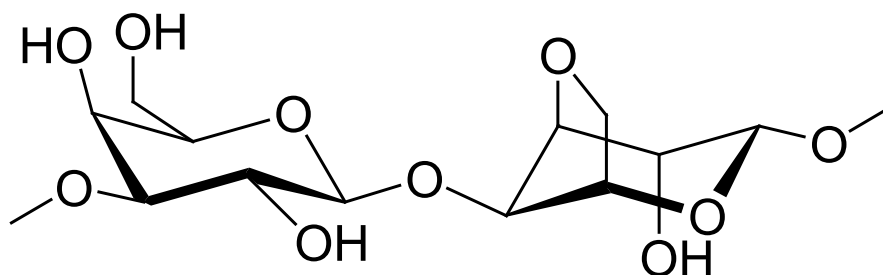


Abb. 7.2 Struktur des sich wiederholenden Bauteils von Agarose.

Anwesenheit der unüblichen 3,6-Anhydro-L-Galactose (Bywater et al. Journal of Chromatography Library, Edited by Heftman).

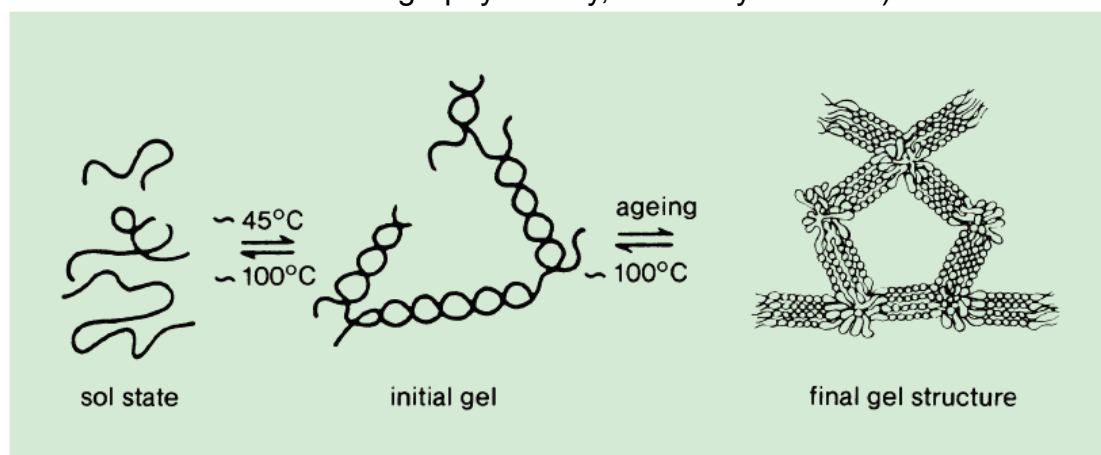


Abb. 7.3 Bildung von Agarosegel (Bywater et al. Journal of Chromatography Library, Edited by Heftman)

7.1.3 Sephadex

Sephadex besteht aus mit Epichlorohydrin quervernetzten Dextranen (Abb. 7.4). Sephadex von G-Typen unterscheiden sich im Maß der Quervernetzung und dementsprechend im Maß des Quellvermögens bzw. des Fraktionierungsbereiches (Tab. 7.2).

Tab. 7.2 Eigenschaften von Sephadex G-50 und Sephadex G-100 (Gel filtration: Principles and Methods, amersham pharmacia biotech)

Geltyp	Partikelgröße μm	Fraktionierungsbereich		Quellfaktor mL/g
		globulare Proteine	Dextran	
Sephadex G-50	20-80	$1,5 \times 10^3 - 3 \times 10^4$	$5 \times 10^2 - 1 \times 10^4$	9-11
Sephadex G-100	40-120	$4 \times 10^3 - 1,5 \times 10^5$	$1 \times 10^3 - 1 \times 10^5$	15-20

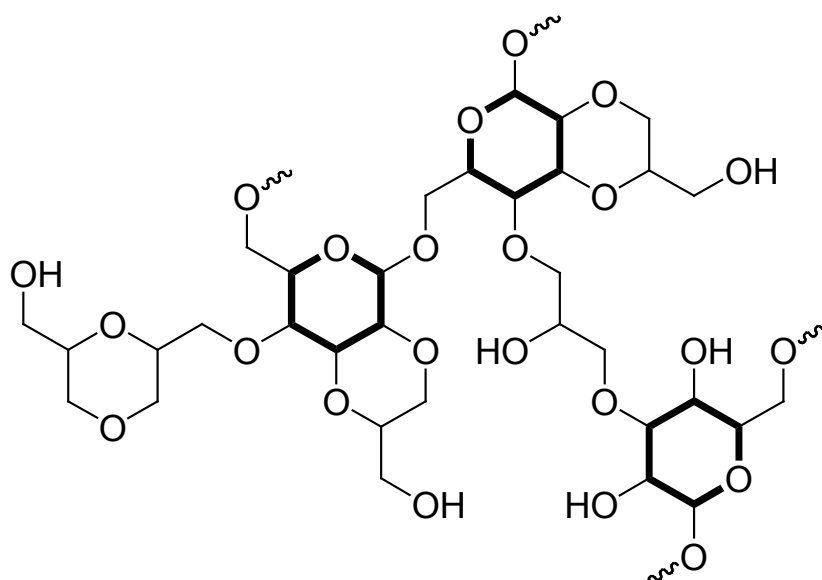


Abb. 7.4 Partielle Struktur von Sephadex (Holmberg et al. 1995)

7.2 Vorbereitung von Säulenmatrizen, Säulenpacken und Äquilibrierung

Zehn Milliliter einer homogenen Suspension von Superdex 200 oder Sepharose 4B, oder jeweils 3 g von Sephadex G-50, Sephadex G-100, Silicagel und Alumina wurden in 30 mL 95% Ethanol gegeben. Nach 15 min Schütteln mit einem Schüttelgerät wurden die Suspensionen dann abfiltriert. Die feuchten Gelmatrizen wurden gesammelt und mit 95% Ethanol, wie vorhin beschrieben, noch mal gewaschen und abfiltriert. Der Waschvorgang wurde noch zweimal wiederholt. Danach wurden absolutes Ethanol und Diethylether

verwendet, damit die Matrizen dehydratisiert wurden. Nach Abfiltration wurden alle Gelmatrizen an der Luft getrocknet und direkt verwendet.

Superdex 200 (75mg getrocknet), Sepharose 4B (75mg getrocknet), Sephadex G-50 (88mg getrocknet) oder Sephadex G-100 (55mg getrocknet) wurden in 1,5 mL einer 10 mM Ammoniumformiat-Lösung (pH 7,4) gegeben und für mindestens 4 Stunden bei RT gequollen. Silicagel (0,3 g) oder Alumina (0,54 g) wurden in 10 mL einer 10 mM Ammoniumformiat-Lösung (pH 7,4) für ungefähr 2 Stunden bei RT inkubiert.

Die komplett gequollenen Superdex 200, Sepharose 4B, Sephadex G-50 und Sephadex G-100 wurden nach dem Homogenisieren in jeweils eine HR5/5 Glassäule eingepackt. Die Säulen wurden mit einer 10 mM Ammoniumformiat-Lösung (pH 7,4) bei 0,2 mL/min für eine Stunde äquilibriert. Für die Packung von Alumina und Silicagel wurde 80% des Überstands vor dem Packen abgegossen und die Äquilibration lief für eine Stunde mit 10 mM Ammoniumformiat-Lösung (pH 7,4) bei 0,2 mL/min.

Die 10 mM Ammoniumformiat-Lösung (pH 7,4) wurde für alle Messungen als mobile Phase verwendet.

7.3 HPLC-System

Die Elutionen mit den mit Superdex 200, Sepharose 4B, Sephadex G-50 und Sephadex G-100 befüllten Säulen wurden mit einem Series 1000 HPLC-System (Aligent, Germany) durchgeführt. Das System enthält einen Autosampler, zwei Gradientenpumpen, einen online-Entgaser und einen Ionenfallendetektor: Bruker Esquire ESI-MS (Bruker, Germany). Die Apparatur lief mit einer 10 mM Ammoniumformiat-Lösung (pH 7,4) bei 0,2 mL/min und das Injektionsvolumen von jeder Probe war 20 µL. Die Bedingungen für den ESI-MS-Detektor waren wie folgt: Nebulizer 30 psi, Dry gas 9 L/min und 365°C, Compound Stability 50%, Trap drive level 100%.

Die Elutionen mit den mit Alumina befüllten Säulen wurden mit einem Aligent 1100 Series LC-MS-System, welches aus einem Autosampler, binären Pumpen, einem DAD-Detektor (Aligent Germany) und einem Ionenfallen-Massenspektrometer mit ESI-Quelle (Bruker, Germany) besteht, durchgeführt. Die mobile Phase war eine 10 mM Ammoniumformiat-Lösung (pH 7,4), und die Flußrate betrug 0,2 mL/min. Das Injektionsvolumen von jeder Probe war 20 µL. Die Bedingungen für den ESI-MS-Detektor waren wie folgt: Nebulizer 30 psi, Dry gas 9 L/min und 365°C, Compound Stability 50%, Trap drive level 100%, Target Masse 240.

7.4 Auswertung

7.4.1 Retentionsfaktor k

Um die Wechselwirkungen zwischen Dodecaborat-Cluster-Verbindungen und den unterschiedlichen Säulenmatrizen einzuschätzen und ihre Stärke zu vergleichen, wurde der Retentionsfaktor k verwendet. (Domínguez et al. 2001)

$$k = (V_R - V_M) / V_M \quad (7-1)$$

Wobei V_R das Retentionsvolumen einer Substanz ist und V_M das Hold-up-Volumen ist. Für die Säulen mit Alumina wurde Thioharnstoff für die Bestimmung von V_M verwendet und für die anderen Säulen wurde V_M mit Kaliumdichromat bestimmt.

7.4.2 Thermodynamik

Die Thermodynamik hier bezieht sich auf Enthalpie, Entropie und Gibbs freie Energie, welche aufgrund der Wechselwirkung zwischen den untersuchten Borclusterverbindungen und Gelmaterialien zustande gekommen sind.

Dafür gibt es die folgenden Gleichungen:

$$\ln K = -\Delta H^\circ / RT + \Delta S^\circ / R \quad (7-2)$$

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K \quad (7-3)$$

T ist die Temperatur, wobei chromatographische Elutionen durchgeführt wurden. Und die Elutionen, bezogen auf ein bestimmtes Gelmaterial (Superdex 200 und Sephadex G-100), wurden bei drei Temperaturen, nämlich 10 °C, 25 °C und 37 °C, durchgeführt.

K ist die Gleichgewichtskonstante (equilibrium constant) und wird wie folgt definiert (Introduction to Modern Liquid Chromatography, Edited by Snyder, L.R., Kirkland, J.J. and Dolan, J. W.).

$$K = k \cdot \Phi \quad (7-4)$$

Bezüglich der Gleichung 7-4 kann die Gleichung 7-2 umgeschrieben werden, nämlich:

$$\ln k = -\Delta H^\circ / RT + \Delta S^\circ / R - \ln \Phi \quad (7-5)$$

Φ ist das Phasenverhältnis, und zwar das Volumenverhältnis zwischen mobiler Phase und stationärer Phase in der Säule. Das Volumen der mobilen Phase in

der Säule ist gleich dem gemessenen Elutionsvolumen von $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ minus dem Volumen der mobilen Phase in Kapillaren (nämlich das Totvolumen der mobilen Phasen in Kapillaren) zwischen dem Injektor und der Säule sowie zwischen der Säule und dem Detektor; mit anderen Worten, die Korrektur des gemessenen Elutionsvolumen von $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ durch das Volumen der Kapillaren, welche die Säule verbinden, ermittelt das Volumen der mobilen Phase in der Säule. Das Volumen der stationären Phase ist gleich das Bettvolumen minus das Volumen der mobilen Phase in der Säule.

Für Superdex 200-Säule ist das gemessene Elutionsvolumen von $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ gleich 0,82 mL und das Volumen der Kapillaren beträgt 0,089 mL. Von daher ist das Volumen der mobilen Phase in der Säule gleich 0,731 mL. Das Bettvolumen der Superdex 200-Säule beträgt 0,825 mL (da die Länge der Säule 4,2 cm und der Innendurchmesser der Säule 5 mm beträgt). Bezüglich des Volumens der mobilen Phase in der Säule und des Bettvolumens ist der Φ -Wert gleich 7,81.

Für Sephadex G-100-Säule ist das gemessene Elutionsvolumen von $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ gleich 0,997 mL und das Volumen der Kapillaren beträgt 0,089 mL. Von daher ist das Volumen der mobilen Phase in der Säule gleich 0,908 mL. Das Bettvolumen der Sephadex G-100-Säule beträgt 0,962 mL (da die Länge der Säule 4,9 cm und der Innendurchmesser der Säule 5 mm beträgt). Bezüglich des Volumens der mobilen Phase in der Säule und des Bettvolumens ist der Φ -Wert gleich 16,78.

7.5 Resultat

7.5.1 Retention von Borclusterverbindungen an unterschiedlichen Säulenmatrizen

Alle Borclusterverbindungen, bis auf Bromid- und Iodidcluster, haben eine Molekülmasse kleiner als 1000. Die Molekülmassen von Bromid- und Iodidcluster liegen zwischen 1200 und 1800. Für die Säulenmaterialien, Superdex 200, Sepharose 4B, Sephadex G-50 und Sephadex G-100, welche häufig als Materialien für Gelfiltration verwendet werden, hätten diese Borclusterverbindungen mit dem Totalvolumen eluiert werden können. Aber in Wirklichkeit war dies nicht der Fall. Die Retentionszeit bzw. das Retentionsvolumen von jeder einzelnen Verbindung an unterschiedlichen Säulenmaterialien und die durch das Retentionsvolumen oder die Retentionszeit berechneten k -Werte sind in Tab. 7.3-Tab. 7.9 aufgelistet. Alle k -Werte sind dann in Tab. 7.10 aufgelistet und wurden miteinander verglichen.

Abb. 7.5 ist die Darstellung bzw. die Vergleiche aller Retentionsfaktoren von Borclusterverbindungen an unterschiedlichen Säulenmaterialien.

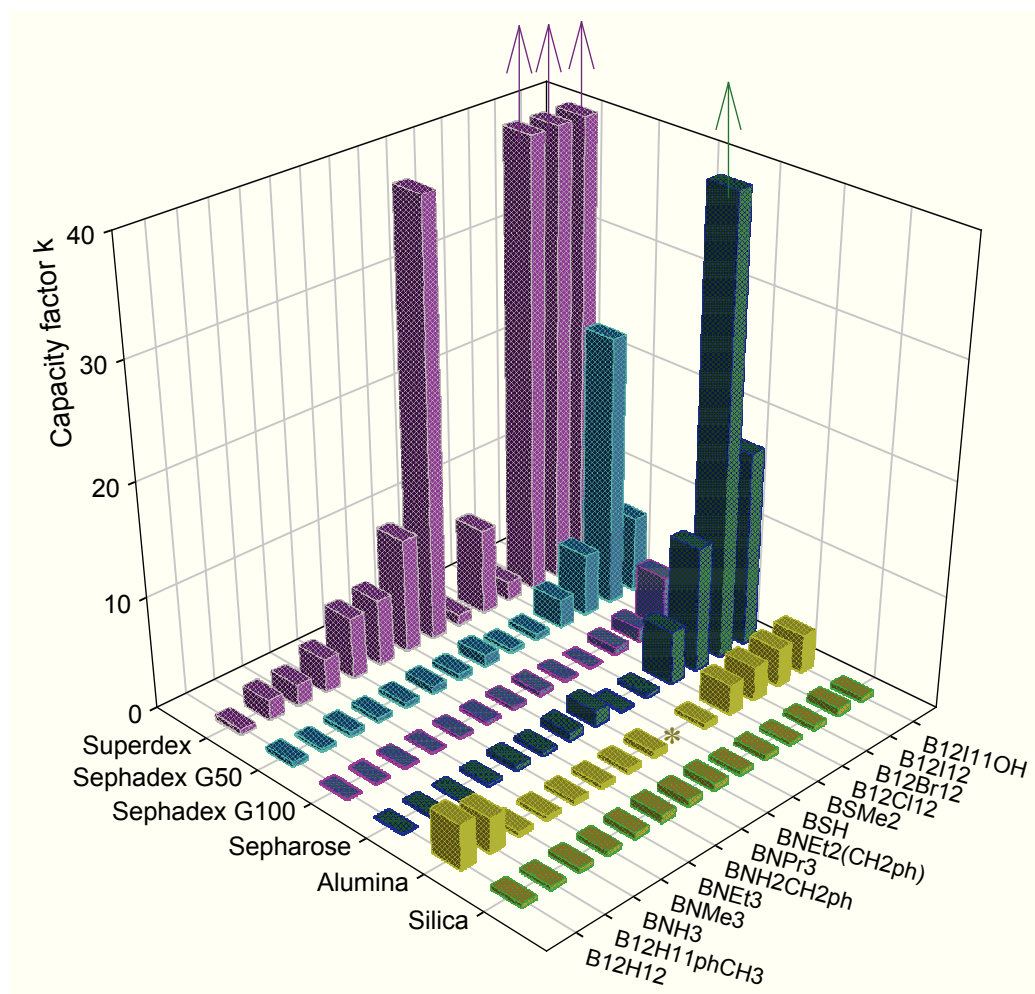


Abb. 7.5 Retentionsfaktoren (k-Werte) von Borclusterverbindungen an unterschiedlichen Säulenmaterialien. Die Pfeile bedeuten diejenigen k-Werte größer als 40 waren. *: nicht gemessen.

Tab. 7.3 k-Werte von Borclusterverbindungen an Superdex 200

Probe	Retentionszeit t_{R1} min	Retentionszeit t_{R2} min	Mittelwert t_R min	Flußrate mL/min	Retentions volumen mL	$V_R - V_M$	$k = (V_R - V_M) / V_M$
$K_2Cr_2O_7$	4,12	4,08	4,10	0,20	0,82		
$Na_2B_{12}H_{12}$	6,10	6,10	6,10	0,20	1,22	0,40	0,49
$Na_2B_{12}H_{11}PhCH_3$	12,50	10,50	11,50	0,20	2,30	1,48	1,80
$NaBNH_3$	12,20	11,60	11,90	0,20	2,38	1,56	1,90
$KBNMe_3$	16,60	15,90	16,25	0,20	3,25	2,43	2,96
$KBNet_3$	28,00	25,00	26,50	0,20	5,30	4,48	5,46
$NaBNH_2CH_2Ph$	30,10	26,50	28,30	0,20	5,66	4,84	5,90
$NaBNPr_3$	48,80	43,00	45,90	0,20	9,18	8,36	10,20
$NaBNet_2(CH_2Ph)$	175,70	148,20	161,95	0,20	32,39	31,57	38,50
Na_2BSH	8,30	7,50	7,90	0,20	1,58	0,76	0,93
$NaBSMe_2$	37,50	33,50	35,50	0,20	7,10	6,28	7,66
$Na_2B_{12}Cl_{12}$	11,50	10,10	10,80	0,20	2,16	1,34	1,63
$Na_2B_{12}Br_{12}$	-	-	-	0,20	-	-	-
$Na_2B_{12}I_{12}$	-	-	-	0,20	-	-	-
$Na_2B_{12}I_{11}OH$	-	-	-	0,20	-	-	-

-: nicht detektiert

Tab. 7.4 k-Werte von Borclusterverbindungen an Sephadex G-50

Probe	Retentionszeit t_{R1} min	Retentionszeit t_{R2} min	Mittelwert t_R min	Flußrate mL/min	Retentions volumen mL	$V_R - V_M$	$k = (V_R - V_M) / V_M$
$K_2Cr_2O_7$	4,95	5,05	5,00	0,20	1,00		
$Na_2B_{12}H_{12}$	7,10	7,10	7,10	0,20	1,42	0,42	0,42
$Na_2B_{12}H_{11}PhCH_3$	6,40	6,10	6,25	0,20	1,25	0,25	0,25
$NaBNH_3$	7,10	7,00	7,05	0,20	1,41	0,41	0,41
$KBNMe_3$	6,90	7,10	7,00	0,20	1,40	0,40	0,40
$KBNet_3$	7,25	7,40	7,33	0,20	1,47	0,47	0,47
$NaBNH_2CH_2Ph$	8,30	8,30	8,30	0,20	1,66	0,66	0,66
$NaBNPr_3$	7,60	7,70	7,65	0,20	1,53	0,53	0,53
$NaBNet_2(CH_2Ph)$	9,85	10,30	10,08	0,20	2,02	1,02	1,02
Na_2BSH	6,70	7,00	6,85	0,20	1,37	0,37	0,37
$NaBSMe_2$	7,70	7,85	7,78	0,20	1,56	0,56	0,56
$Na_2B_{12}Cl_{12}$	17,50	17,60	17,55	0,20	3,51	2,51	2,51
$Na_2B_{12}Br_{12}$	31,50	33,70	32,60	0,20	6,52	5,52	5,52
$Na_2B_{12}I_{12}$	125,00	125,00	125,00	0,20	25,00	24,00	24,00
$Na_2B_{12}I_{11}OH$	37,90	39,30	38,60	0,20	7,72	6,72	6,72

Tab. 7.5 k-Werte von Borclusterverbindungen an Sephadex G-100

Probe	Retentionszeit t_{R1} min	Retentionszeit t_{R2} min	Mittelwert t_R min	Flußrate mL/min	Retentions volumen mL	$V_R - V_M$	$k = (V_R - V_M) / V_M$
$K_2Cr_2O_7$	4,95	4,95	4,95	0,20	0,99		
$Na_2B_{12}H_{12}$	5,60	5,50	5,55	0,20	1,11	0,12	0,12
$Na_2B_{12}H_{11}PhCH_3$	5,35	5,80	5,58	0,20	1,12	0,13	0,13
$NaBNH_3$	5,90	5,70	5,80	0,20	1,16	0,17	0,17
$KBNMe_3$	5,80	5,40	5,60	0,20	1,12	0,13	0,13
$KBNet_3$	5,80	5,90	5,85	0,20	1,17	0,18	0,18
$NaBNH_2CH_2Ph$	6,10	6,30	6,20	0,20	1,24	0,25	0,25
$NaBNPr_3$	6,20	6,20	6,20	0,20	1,24	0,25	0,25
$NaBNet_2(CH_2Ph)$	6,75	7,15	6,95	0,20	1,39	0,40	0,40
Na_2BSH	6,20	5,70	5,95	0,20	1,19	0,20	0,20
$NaBSMe_2$	5,30	5,70	5,50	0,20	1,10	0,11	0,11
$Na_2B_{12}Cl_{12}$	8,50	8,30	8,40	0,20	1,68	0,69	0,70
$Na_2B_{12}Br_{12}$	11,00	10,70	10,85	0,20	2,17	1,18	1,19
$Na_2B_{12}I_{12}$	28,60	28,50	28,55	0,20	5,71	4,72	4,77
$Na_2B_{12}I_{11}OH$	12,20	12,10	12,15	0,20	2,43	1,44	1,45

Tab. 7.6 k-Werte von Borclusterverbindungen an Sepharose 4B

Probe	Retentionszeit t_{R1} min	Retentionszeit t_{R2} min	Mittelwert t_R min	Flußrate mL/min	Retentions volumen mL	$V_R - V_M$	$k = (V_R - V_M) / V_M$
$K_2Cr_2O_7$	4,60	4,60	4,60	0,20	0,92		
$Na_2B_{12}H_{12}$	6,40	6,40	6,40	0,20	1,28	0,36	0,39
$Na_2B_{12}H_{11}PhCH_3$	6,80	6,70	6,75	0,20	1,35	0,43	0,47
$NaBNH_3$	6,70	6,70	6,70	0,20	1,34	0,42	0,46
$KBNMe_3$	7,10	7,00	7,05	0,20	1,41	0,49	0,53
$KBNEt_3$	8,20	8,10	8,15	0,20	1,63	0,71	0,77
$NaBNH_2CH_2Ph$	7,60	7,50	7,55	0,20	1,51	0,59	0,64
$NaBNPr_3$	9,10	9,00	9,05	0,20	1,81	0,89	0,97
$NaBNEt_2(CH_2Ph)$	11,90	11,50	11,70	0,20	2,34	1,42	1,54
Na_2BSH	6,60	6,50	6,55	0,20	1,31	0,39	0,42
$NaBSMe_2$	8,00	7,80	7,90	0,20	1,58	0,66	0,72
$Na_2B_{12}Cl_{12}$	23,60	22,50	23,05	0,20	4,61	3,69	4,01
$Na_2B_{12}Br_{12}$	-	-	-	0,20	-	-	-
$Na_2B_{12}I_{12}$	-	-	-	0,20	-	-	-
$Na_2B_{12}I_{11}OH$	-	-	-	0,20	-	-	-

-: nicht detektiert

Tab. 7.7 k-Werte von Borclusterverbindungen an Sepharose 4B

Probe	Retentionszeit min	Mittelwert min	Flußrate mL/min	Retentions volumen mL	$V_R - V_M$	$k = (V_R - V_M) / V_M$
$K_2Cr_2O_7$	6,00	6,00	0,20	1,20		
$Na_2B_{12}H_{12}$	-	-	0,20	-	-	-
$Na_2B_{12}H_{11}PhCH_3$	7,70	7,70	0,20	1,54	0,34	0,28
$NaBNH_3$	7,10	7,10	0,20	1,42	0,22	0,18
$KBNMe_3$	7,70	7,70	0,20	1,54	0,34	0,28
$KBNEt_3$	9,30	9,30	0,20	1,86	0,66	0,55
$NaBNH_2CH_2Ph$	8,40	8,40	0,20	1,68	0,48	0,40
$NaBNPr_3$	11,20	11,20	0,20	2,24	1,04	0,87
$NaBNEt_2(CH_2Ph)$	15,50	15,50	0,20	3,10	1,90	1,58
Na_2BSH	-	-	0,20	-	-	-
$NaBSMe_2$	7,70	7,70	0,20	1,54	0,34	0,28
$Na_2B_{12}Cl_{12}$	40,90	40,90	0,20	8,18	6,98	5,82
$Na_2B_{12}Br_{12}$	72,50	72,50	0,20	14,50	13,30	11,08
$Na_2B_{12}I_{12}$	-	-	0,20	-	-	-
$Na_2B_{12}I_{11}OH$	110,00	110,00	0,20	22,00	20,80	17,33

-: nicht detektiert

Tab. 7.8 k-Werte von Borclusterverbindungen an Silicagel

Probe	Retentionszeit t_{R1} min	Retentionszeit t_{R2} min	Mittelwert t_R min	Flußrate mL/min	Retentions volumen mL	$V_R - V_M$	$k = (V_R - V_M) / V_M$
$K_2Cr_2O_7$	2,25	2,25	2,25	0,20	0,45		
$Na_2B_{12}H_{12}$	3,10	3,10	3,10	0,20	0,62	0,17	0,38
$Na_2B_{12}H_{11}PhCH_3$	3,00	3,10	3,05	0,20	0,61	0,16	0,36
$NaBNH_3$	3,20	3,20	3,20	0,20	0,64	0,19	0,42
$KBNMe_3$	3,20	3,20	3,20	0,20	0,64	0,19	0,42
$KBNet_3$	3,50	3,50	3,50	0,20	0,70	0,25	0,56
$NaBNH_2CH_2Ph$	3,70	4,10	3,90	0,20	0,78	0,33	0,73
$NaBNPr_3$	3,70	3,70	3,70	0,20	0,74	0,29	0,64
$NaBNet_2(CH_2Ph)$	3,75	3,75	3,75	0,20	0,75	0,30	0,67
Na_2BSH	3,10	3,20	3,15	0,20	0,63	0,18	0,40
$NaBSMe_2$	3,30	3,30	3,30	0,20	0,66	0,21	0,47
$Na_2B_{12}Cl_{12}$	2,90	2,90	2,90	0,20	0,58	0,13	0,29
$Na_2B_{12}Br_{12}$	3,30	3,10	3,20	0,20	0,64	0,19	0,42
$Na_2B_{12}I_{12}$	3,90	3,80	3,85	0,20	0,77	0,32	0,71
$Na_2B_{12}I_{11}OH$	3,20	3,30	3,25	0,20	0,65	0,20	0,44

Tab. 7.9 k-Werte von Borclusterverbindungen an Alumina

Probe	Retentionszeit t_{R1} min	Retentionszeit t_{R2} min	Mittelwert t_R min	Flußrate mL/min	Retentions volumen mL	$V_R - V_M$	$k = (V_R - V_M) / V_M$
Thioharnstoff	2,85	2,90	2,88	0,20	0,58		
$\text{Na}_2\text{B}_{12}\text{H}_{12}$	13,90	14,80	14,35	0,20	2,87	2,30	3,99
$\text{Na}_2\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{PhCH}_3$	11,10	12,50	11,80	0,20	2,36	1,79	3,10
NaBNH_3	4,10	4,10	4,10	0,20	0,82	0,25	0,43
KBNMe_3	4,00	4,00	4,00	0,20	0,80	0,23	0,39
KBNet_3	4,00	4,00	4,00	0,20	0,80	0,23	0,39
$\text{NaBNH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$	4,00	4,00	4,00	0,20	0,80	0,23	0,39
NaBNPr_3	4,00	4,10	4,05	0,20	0,81	0,24	0,41
$\text{NaBNet}_2(\text{CH}_2\text{Ph})$	4,70	4,50	4,60	0,20	0,92	0,35	0,60
Na_2BSH	-	-	-	0,20	-	-	-
NaBSMe_2	4,10	4,10	4,10	0,20	0,82	0,25	0,43
$\text{Na}_2\text{B}_{12}\text{Cl}_{12}$	9,70	11,10	10,40	0,20	2,08	1,51	2,62
$\text{Na}_2\text{B}_{12}\text{Br}_{12}$	10,70	12,20	11,45	0,20	2,29	1,72	2,98
$\text{Na}_2\text{B}_{12}\text{I}_{12}$	11,90	13,20	12,55	0,20	2,51	1,94	3,37
$\text{Na}_2\text{B}_{12}\text{I}_{11}\text{OH}$	11,90	13,50	12,70	0,20	2,54	1,97	3,42

-: nicht gemessen

Tab. 7.10 Retentionfaktoren (k-Werte) von allen Borclusterverbindungen an unterschiedlichen Matrizen

	Superdex 200	Sephadex G-50	Sephadex G-100	Sepharose 4B	Alumina	Silica gel
$B_{12}H_{12}^{2-}$	0,49	0,42	0,12	0,39	3,96	0,38
$B_{12}H_{11}PhCH_3^{2-}$	1,80	0,25	0,13	0,47	3,08	0,36
BNH_3^-	1,90	0,41	0,17	0,46	0,42	0,42
$BNMe_3^-$	2,96	0,40	0,13	0,53	0,39	0,42
$BNEt_3^-$	5,46	0,47	0,18	0,77	0,39	0,56
$BNPr_3^-$	10,20	0,53	0,25	0,97	0,41	0,64
$BNEt_2(CH_2Ph)^-$	38,50	1,02	0,40	1,54	0,60	0,67
$BNH_2CH_2Ph^-$	5,90	0,66	0,25	0,64	0,39	0,73
BSH^{2-}	0,93	0,37	0,20	0,42	-	0,40
$BSMe_2^-$	7,66	0,56	0,11	0,72	0,43	0,47
$B_{12}Cl_{12}^{2-}$	1,63	2,51	0,70	4,01	2,62	0,29
$B_{12}Br_{12}^{2-}$	>40	5,52	1,19	11,08	2,98	0,42
$B_{12}I_{12}^{2-}$	>40	24,00	4,77	>40	3,37	0,71
$B_{12}I_{11}OH^{2-}$	>40	6,72	1,45	17,33	3,42	0,44

-: nicht gemessen. Die Retentionsfaktoren für die Säulen wurden auf 0 für $K_2Cr_2O_7$ gesetzt, mit Ausnahme von Alumina, wobei Thioharnstoff verwendet wurde.

Superdex 200 verzögerte fast alle Borclusterverbindungen, besondere starke Retentionen wurden bei halogenierten Clusterverbindungen und bei jenen Clusterverbindungen, die eine Kohlenstoffkette oder Kohlenstoffketten enthalten, beobachtet. Je länger die Kohlenstoffkette und je mehr die Kohlenstoffketten in einem Molekül sind, desto stärker wurden die Clusterverbindungen verzögert. Beispielsweise beträgt der k-Wert von dem stickstoffhaltigen BNH_3^- 1,90 und die k-Werte von dessen Derivaten, nämlich $BNMe_3^-$, $BNEt_3^-$, $BNH_2CH_2Ph^-$, $BNPr_3^-$ und $BNEt_2CH_2Ph^-$ waren 2,96, 5,46, 5,90, 10,20 und 38,50. Für die halogenierten Clusterverbindungen ist die Retention mit steigender Größe des Halogenatoms stärker geworden und sie wurden sogar in sechs Stunden nicht detektiert.

Die Retentionen von allen Clusterverbindungen an Sepharose 4B und Sephadex G-50 zeigten ähnliche Tendenzen. Die halogenierten Verbindungen hatten die stärksten Retentionen und mit steigender Größe des Halogenatoms

waren die Retentionen länger. Die k -Werte von halogenierten Clusterverbindungen an Sepharose 4B waren größer als die an Sephadex G-50. Außer den halogenierten Clusterverbindungen waren auch die k -Werte von $\text{BNet}_2\text{CH}_2\text{Ph}^-$ an Sepharose 4B und Sephadex G-50 auffällig. Sie lagen bei 1,41 und 1,02. Die k -Werte von den meisten übrigen Verbindungen lagen unter 0,5 und sie zeigten schwache oder relativ schwache Wechselwirkung mit den beiden Materialien.

Sephadex G-100 verzögerte die halogenierten Clusterverbindungen und deren Retentionsfaktoren (k -Werte) lagen zwischen 0,7 und 4,8. Diese k -Werte waren viel kleiner im Vergleich zu denen an Sephadex G-50, was bedeutet, dass die Retentionen von den halogenierten Clusterverbindungen an Sephadex G-100 schwächer waren. Die anderen Clusterverbindungen hatten auch kleine Retentionen, die k -Werte waren kleiner als 0,4. Die verkleinerte Retention könnte eventuell daran liegen, dass Sephadex G-100 einen niedrigeren Grad an Quervernetzung besitzt als Sephadex G-50.

Alumina (Aluminiumoxid) und Silicagel sind zwei anorganische Matrizen. Aluminiumoxid konnte den unsubstituierten Cluster, den Phenylmethyl-substituierten Cluster und die halogenierten Clusterverbindungen, verzögern. Ihre k -Werte lagen zwischen 2,6 und 4,0. Die anderen Clusterverbindungen zeigten niedrigere Retentionen an Aluminiumoxid und die Retentionsfaktoren waren fast kleiner als 0,5. Für Silicagel waren alle k -Werte nicht groß, sie lagen zwischen 0,29 und 0,71. Das heißt, alle untersuchten Clusterverbindungen hatten kleine Wechselwirkungen mit Silicagel.

7.5.2 Enthalpie, Entropie und Gibbs freie Energie der Wechselwirkungen

Mit Superdex 200 und Sephadex G-100 wurden zwei Gelmaterialien gewählt. Die Enthalpie, die Entropie und die freie Enthalpie, bezogen auf die Wechselwirkung von $\text{B}_{12}\text{H}_{12}^{2-}$, BNH_3^- , BNMe_3^- , BNet_3^- mit Superdex 200 und von $\text{B}_{12}\text{H}_{12}^{2-}$, $\text{B}_{12}\text{Cl}_{12}^{2-}$, $\text{B}_{12}\text{Br}_{12}^{2-}$, $\text{B}_{12}\text{I}_{12}^{2-}$ mit Sephadex G-100, können mit Hilfe ihrer chromatographischen Daten, die durch Messungen bei 283K, 298K und 310 K erhalten wurden, abgeleitet werden.

Das Retentionsvolumen V_R von $\text{B}_{12}\text{H}_{12}^{2-}$, BNH_3^- , BNMe_3^- und BNet_3^- , welches mit Superdex 200 gemessen wurde und die durch V_R berechneten $\ln k$ -Werte bzw. die weiteren ΔG° -Werte sind in Tab. 7.11 gelistet. Das Retentionsvolumen V_R von $\text{B}_{12}\text{H}_{12}^{2-}$, $\text{B}_{12}\text{Cl}_{12}^{2-}$, $\text{B}_{12}\text{Br}_{12}^{2-}$ und $\text{B}_{12}\text{I}_{12}^{2-}$, welches mit Sephadex G-100 gemessen wurde und die durch V_R berechneten $\ln k$ -Werte bzw. die weiteren ΔG° -Werte sind in Tab. 7.12 gelistet.

Durch das Auftragen von $\ln k$ gegen $1/T$ für die beiden Matrizen (Abb. 7.6a und

Abb. 7.7a) können die ΔH° -Werte mit Hilfe von Steigung ($-\Delta H^\circ/R$) jeder einzelnen Substanz und die ΔS° -Werte mit Hilfe vom Achsenabschnitt ($\Delta S^\circ/R - \ln\Phi$) berechnet werden.

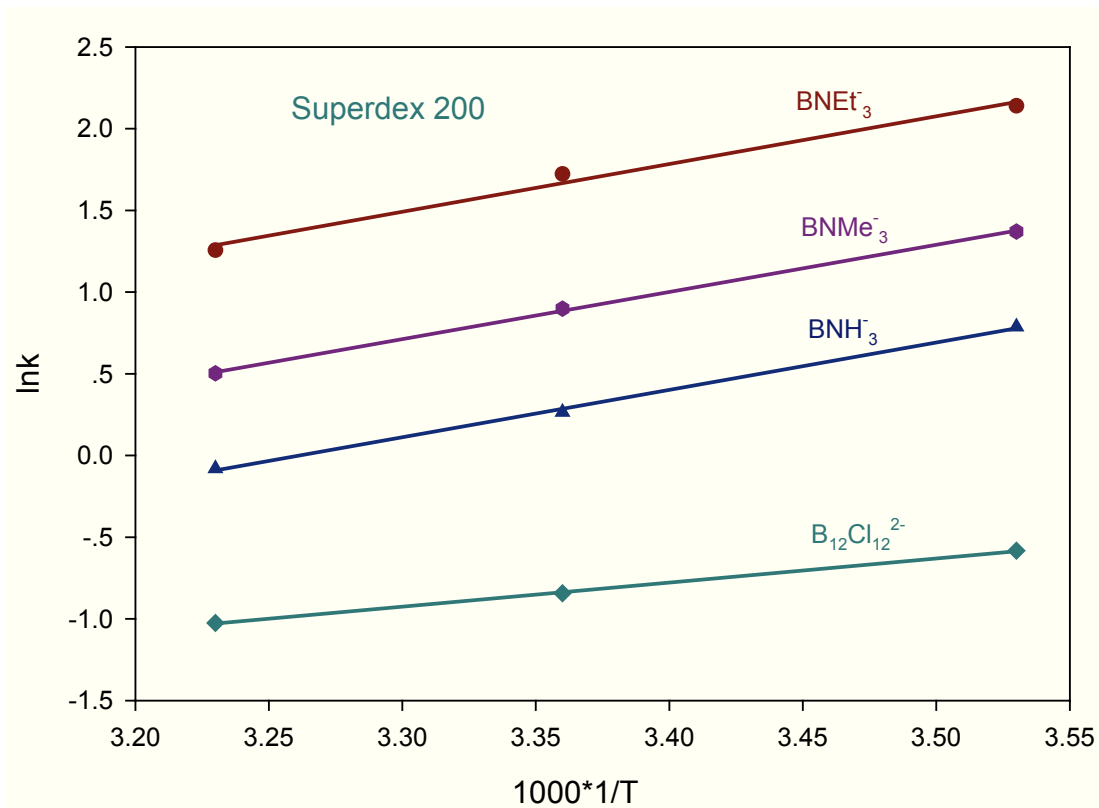


Abb. 7.6a Auftragen von $\ln K$ gegen $1000 \cdot 1/T$, gemessen mit Superdex 200 als Matrix und $B_{12}H_{12}^{2-}$, BNH_3^- , $BNMe_3^-$ und $BNEt_3^-$ als Substanzen

Für $B_{12}Cl_{12}^{2-}$ an Superdex 200 gab es folgende Gleichung:

$$\ln K = 1435,5/T - 5,657, R^2 = 0,9998$$

$$-\Delta H^\circ/R = 1435,5 \text{ und } \Delta S^\circ/R - \ln\Phi = -5,657$$

$$\Delta H^\circ = -1435,5 \cdot R = -11935,0 \text{ J/mol} = -11,94 \text{ kJ/mol};$$

$$\Delta S^\circ/R = (-5,657 + \ln\Phi) \cdot R = (-5,657 + \ln 7,81) \cdot 8,314 = -29,94 \text{ J/(mol} \cdot \text{K)}$$

Für BNH_3^- an Superdex 200 gab es folgende Gleichung:

$$\ln K = 2824,0/T - 9,198, R^2 = 0,9993$$

$$-\Delta H^\circ/R = 2824,0 \text{ und } \Delta S^\circ/R - \ln\Phi = -9,198$$

$$\Delta H^\circ = -2824,0 \cdot R = -23479,2 \text{ J/mol} = -23,48 \text{ kJ/mol};$$

$$\Delta S^\circ/R = (-9,198 + \ln\Phi) \cdot R = (-9,198 + \ln 7,81) \cdot 8,314 = -59,37 \text{ J/(mol} \cdot \text{K)}$$

Für $BNMe_3^-$ an Superdex 200 gab es folgende Gleichung:

$$\ln K = 2805,4/T - 8,535, R^2 = 0,9985$$

$$-\Delta H^\circ/R = 2805,4 \text{ und } \Delta S^\circ/R - \ln\Phi = -8,535$$

$$\Delta H^\circ = -2805,4 \cdot R = -23324,5 \text{ J/mol} = -23,32 \text{ kJ/mol};$$

$$\Delta S^\circ/R = (-8,535 + \ln \Phi) \cdot R = (-8,535 + \ln 7,81) \cdot 8,314 = -53,87 \text{ J/(mol} \cdot \text{K)}$$

Für BNEt_3^- an Superdex 200 gab es folgende Gleichung:

$$\ln k = 2837,4/T - 7,861, R^2 = 0,9854$$

$$-\Delta H^\circ/R = 2837,4 \text{ und } \Delta S^\circ/R - \ln \Phi = -7,861$$

$$\Delta H^\circ = -2837,4 \cdot R = -23590,6 \text{ J/mol} = -23,59 \text{ kJ/mol};$$

$$\Delta S^\circ/R = (-7,861 + \ln \Phi) \cdot R = (-7,861 + \ln 7,81) \cdot 8,314 = -48,26 \text{ J/(mol} \cdot \text{K)}$$

Die ΔH° - und ΔS° -Werte sind in Tab. 7.13 gelistet.

Die Änderung von ΔH° war negativ für alle untersuchten Borclusterverbindungen. Das bedeutet, dass Wärme freigesetzt wurde. Je länger die Kohlenstoffketten von BNR_3^- sind, desto mehr thermische Energie wurde freigesetzt, wenn die Verbindung mit Superdex 200 wechselwirkte. Die Änderung von ΔS° war auch negativ für alle untersuchten Borclusterverbindungen, was bedeutet, dass die Ordnung des Systems schwach reduziert wurde. Es gab eine gute Korrelation zwischen ΔH° und ΔS° , die negative Änderung von ΔH° wurde durch die negative Änderung von ΔS° kompensiert (Abb. 7.6b).

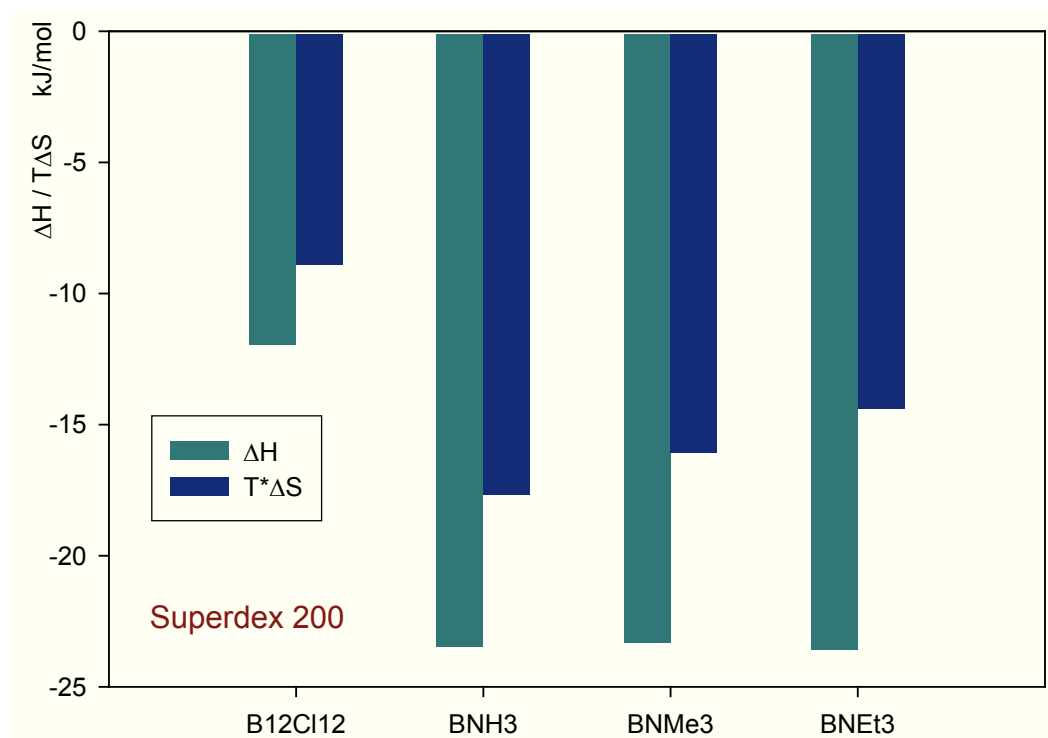


Abb. 7.6b Kompensieren von ΔH° durch $T\Delta S^\circ$ ($T = 298 \text{ K}$), gemessen mit Superdex 200 als Matrix und $\text{B}_{12}\text{H}_{12}^{2-}$, BNH_3^- , BNMe_3^- und BNEt_3^- als Substanzen

Tab. 7.11 Retentionsvolumina, K-Werte und ΔG° -Werte von $B_{12}H_{12}^{2-}$, BNH_3^- , $BNMe_3^-$, BNH_3^- mit Superdex 200 bei drei Temperaturen

Probe	Retentionszeit t_{R1} min	Retentionszeit t_{R2} min	Mittelwert t_R min	Flußrate mL/min	Retentions volumen mL	$K=k \cdot \Phi$	$\ln K$	ΔG° T=283K
$K_2Cr_2O_7$	3,91	3,92	3,92	0,20	0,78			
$Na_2B_{12}Cl_{12}$	6,20	6,00	6,10	0,20	1,22	4,36	1,47	-3,46
$NaBNH_3$	12,80	12,30	12,55	0,20	2,51	17,16	2,84	-6,69
$KBNMe_3$	19,90	18,80	19,35	0,20	3,87	30,73	3,43	-8,06
$KBNEt_3$	37,80	36,60	37,20	0,20	7,44	66,36	4,20	-9,87
Probe	Retentionszeit t_{R1} min	Retentionszeit t_{R2} min	Mittelwert t_R min	Flußrate mL/min	Retentions volumen mL	$K=k \cdot \Phi$	$\ln K$	ΔG° T=298K
$K_2Cr_2O_7$	3,95	3,95	3,95	0,20	0,79			
$Na_2B_{12}Cl_{12}$	5,70	5,60	5,65	0,20	1,13	3,36	1,21	-3,02
$NaBNH_3$	9,20	9,00	9,10	0,20	1,82	10,19	2,32	-5,79
$KBNMe_3$	13,80	13,50	13,65	0,20	2,73	19,19	2,95	-7,27
$KBNEt_3$	26,30	25,80	26,05	0,20	5,21	43,71	3,78	-9,21
Probe	Retentionszeit t_{R1} min	Retentionszeit t_{R2} min	Mittelwert t_R min	Flußrate mL/min	Retentions volumen mL	$K=k \cdot \Phi$	$\ln K$	ΔG° T=310K
$K_2Cr_2O_7$	3,90	3,90	3,90	0,20	0,78			
$Na_2B_{12}Cl_{12}$	5,30	5,30	5,30	0,20	1,06	2,80	1,03	-2,66
$NaBNH_3$	7,60	7,50	7,55	0,20	1,51	7,21	1,98	-5,09
$KBNMe_3$	10,50	10,30	10,40	0,20	2,08	12,92	2,56	-6,60
$KBNEt_3$	17,70	17,60	17,65	0,20	3,53	27,45	3,31	-8,54

Tab. 7.12 Retentionsvolumina, K-Werte und ΔG° -Werte von $B_{12}H_{12}^{2-}$, $B_{12}Cl_{12}^{2-}$, $B_{12}Br_{12}^{2-}$, $B_{12}I_{12}^{2-}$ mit Sephadex G-100 bei drei Temperaturen

Probe	Retentionszeit t_{R1} min	Retentionszeit t_{R2} min	Mittelwert t_R min	Flußrate mL/min	Retentions volumen mL	$K=k \cdot \Phi$	$\ln K$	ΔG° T=283K
$K_2Cr_2O_7$	5,20	5,20	5,20	0,20	1,04			
$Na_2B_{12}H_{12}$	6,20	6,20	6,20	0,20	1,24	3,23	1,17	-2,76
$Na_2B_{12}Cl_{12}$	11,60	11,10	11,35	0,20	2,27	21,62	3,07	-7,23
$Na_2B_{12}Br_{12}$	17,70	17,10	17,40	0,20	3,48	41,14	3,72	-8,75
$Na_2B_{12}I_{12}$	60,60	60,50	60,55	0,20	12,11	180,37	5,20	-12,22
Probe	Retentionszeit t_{R1} min	Retentionszeit t_{R2} min	Mittelwert t_R min	Flußrate mL/min	Retentions volumen mL	$K=k \cdot \Phi$	$\ln K$	ΔG° T=298K
$K_2Cr_2O_7$	4,65	4,65	4,65	0,20	0,93			
$Na_2B_{12}H_{12}$	5,40	5,50	5,45	0,20	1,09	2,89	1,06	-2,34
$Na_2B_{12}Cl_{12}$	8,30	8,40	8,35	0,20	1,67	13,35	2,59	-6,62
$Na_2B_{12}Br_{12}$	11,60	11,60	11,60	0,20	2,32	25,08	3,22	-8,04
$Na_2B_{12}I_{12}$	29,30	29,20	29,25	0,20	5,85	88,76	4,49	-10,53
Probe	Retentionszeit t_{R1} min	Retentionszeit t_{R2} min	Mittelwert t_R min	Flußrate mL/min	Retentions volumen mL	$K=k \cdot \Phi$	$\ln K$	ΔG° T=310K
$K_2Cr_2O_7$	5,10	5,10	5,10	0,20	1,02			
$Na_2B_{12}H_{12}$	5,70	5,70	5,70	0,20	1,14	1,97	0,68	-1,75
$Na_2B_{12}Cl_{12}$	8,20	8,10	8,15	0,20	1,63	11,51	2,44	-6,30
$Na_2B_{12}Br_{12}$	10,10	10,50	10,30	0,20	2,06	18,59	2,92	-7,53
$Na_2B_{12}I_{12}$	20,80	21,20	21,00	0,20	4,20	53,79	3,99	-10,27

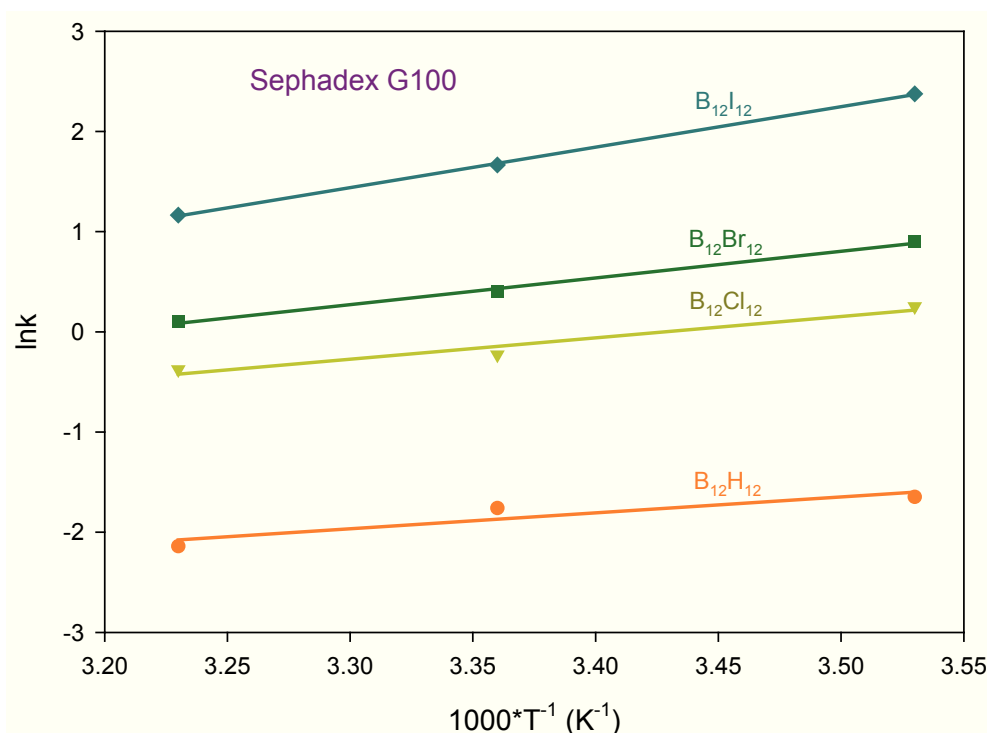


Abb. 7.7a Auftragen von $\ln K$ gegen $1000 \cdot 1/T$, gemessen mit Sephadex G100 als Matrix und $B_{12}H_{12}^{2-}$, $B_{12}Cl_{12}^{2-}$, $B_{12}Br_{12}^{2-}$ und $B_{12}I_{12}^{2-}$ als Substanzen

Für $B_{12}H_{12}^{2-}$ an Sephadex G-100 gab es folgende Gleichung:

$$\ln K = 1538,9/T - 7,038, R^2 = 0,8515$$

$$-\Delta H^\circ/R = 1538,9 \text{ und } \Delta S^\circ/R - \ln \Phi = -7,038$$

Für $B_{12}Cl_{12}^{2-}$ an Sephadex G-100 gab es folgende Gleichung:

$$\ln K = 2086,3/T - 7,152, R^2 = 0,9576$$

$$-\Delta H^\circ/R = 2086,3 \text{ und } \Delta S^\circ/R - \ln \Phi = -7,152$$

Für $B_{12}Br_{12}^{2-}$ an Sephadex G-100 gab es folgende Gleichung:

$$\ln K = 2593,4/T - 8,277, R^2 = 0,9974$$

$$-\Delta H^\circ/R = 2593,4 \text{ und } \Delta S^\circ/R - \ln \Phi = -8,277$$

Für $B_{12}I_{12}^{2-}$ an Sephadex G-100 gab es folgende Gleichung:

$$\ln K = 3934,6/T - 11,531, R^2 = 0,9999$$

$$-\Delta H^\circ/R = 3934,6 \text{ und } \Delta S^\circ/R - \ln \Phi = -11,531$$

Die ΔH° - und ΔS° -Werte sind in Tab. 7.13 gelistet.

Die Änderung von ΔH° war negativ für alle untersuchten Borclusterverbindungen. Das bedeutet, dass Wärme freigesetzt wurde. Je größer das Halogenatom von $B_{12}Hal_{12}^{2-}$ ist, desto mehr thermische Energie wurde freigesetzt, wenn die Verbindung mit

Sephadex G-100 wechselwirkte. Die Änderung von ΔS° war auch negativ für alle untersuchten Borclusterverbindungen, was bedeutet, dass die Ordnung des Systems schwach reduziert wurde. Es gab eine gute Korrelation zwischen ΔH° und ΔS° , die negative Änderung von ΔH° wurde durch die negative Änderung von ΔS° kompensiert (Abb. 7.7b).

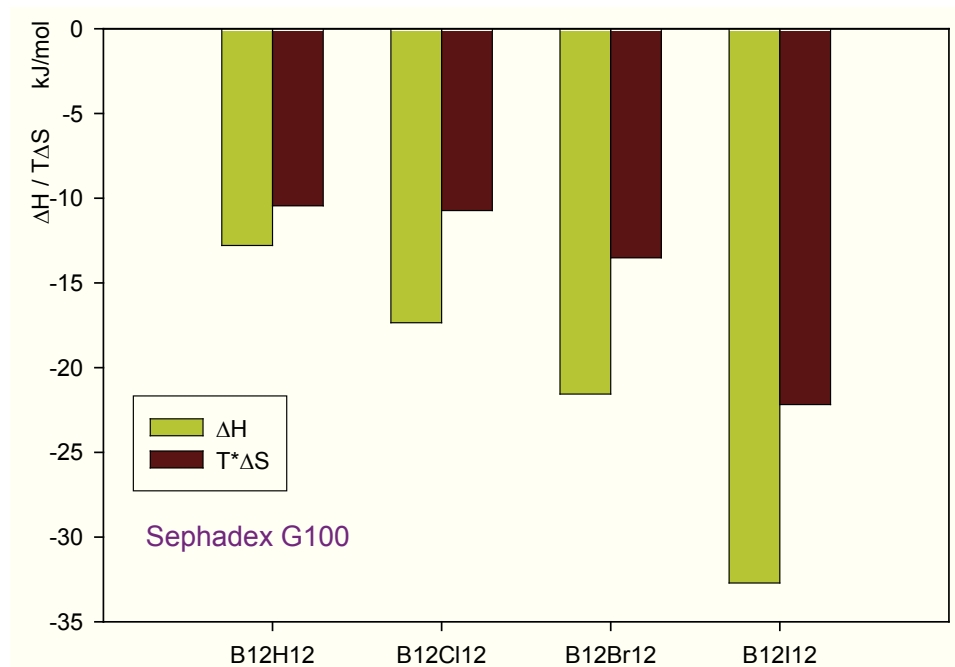


Abb. 7.7b Kompensieren von ΔH° durch $T\Delta S^\circ$ ($T = 298$ K), gemessen mit Sephadex G100 als Matrix und B₁₂H₁₂²⁻, B₁₂Cl₁₂²⁻, B₁₂Br₁₂²⁻ und B₁₂I₁₂²⁻ als Substanzen

Tab. 7.13 ΔH° and ΔS° von Verbindungen an Superdex 200 und Sephadex G-100

	ΔS° J mol ⁻¹ K ⁻¹	ΔH° kJ mol ⁻¹	ΔG° (25°C) kJ mol ⁻¹	$T\Delta S^\circ$ (25°C) kJ mol ⁻¹
Superdex				
Na ₂ B ₁₂ Cl ₁₂	-29,94	-11,94	-3,02	-8,92
NaBNH ₃	-59,37	-23,48	-5,79	-17,69
KBNMe ₃	-53,87	-23,32	-7,27	-16,05
KBNEt ₃	-48,26	-23,59	-9,21	-14,38
Sephadex G-100				
Na ₂ B ₁₂ H ₁₂	-35,07	-12,79	-2,34	-10,45
Na ₂ B ₁₂ Cl ₁₂	-36,01	-17,35	-6,62	-10,73
Na ₂ B ₁₂ Br ₁₂	-45,37	-21,56	-8,04	-13,52
Na ₂ B ₁₂ I ₁₂	-74,42	-32,71	-10,53	-22,18

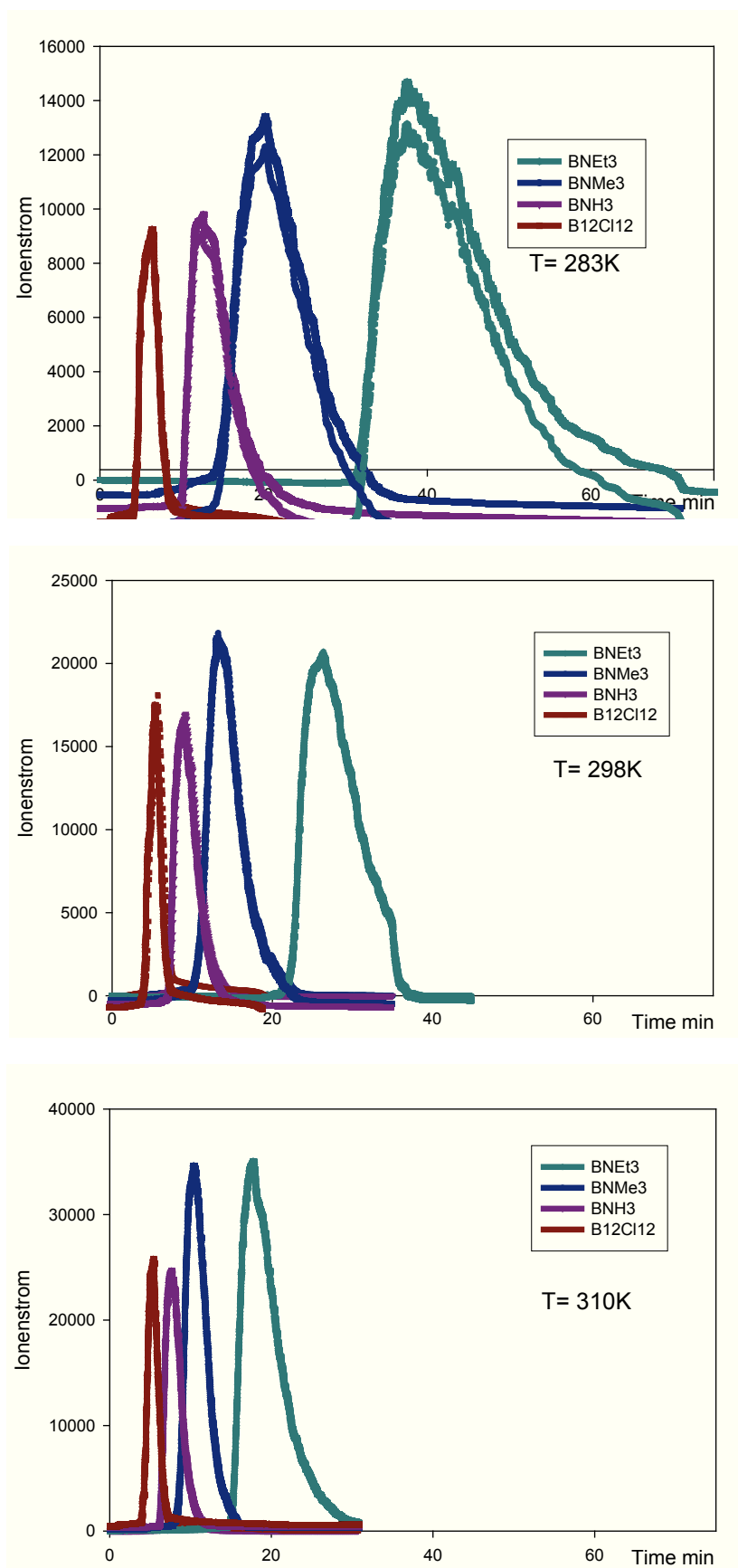


Abb. 7.8 Chromatogramme von $B_{12}H_{12}^{2-}$, BNH_3^- , $BNMe_3^-$ und $BNEt_3^-$ an Superdex 200 bei drei Temperaturen

7.6 Diskussion

Es ist erstaunlich, dass es starke Wechselwirkung zwischen den Substanzen, die in Wasser gut löslich sind, und den chromatographischen Matrizen, welche für minimale Wechselwirkung in wässrigem Medium gedacht sind, gibt. Früher wurden die Retentionen von Ionen und neutralen Molekülen an Matrizen, welche auf Dextran basieren, bei den stark quervernetzten Sephadex G10 und G15 beobachtet (Ujimoto et al. 1981a, Yano et al. 1980, Haglund et al. 1980 and Collins 1995). Beispiele sind die Retentionen von aliphatischen Alkoholen an den stark quervernetzten Sephadexgelen, eventuell findet die Retention aufgrund der Wechselwirkung von aliphatischen Alkoholen mit der quervernetzten Baueinheit statt (Ujimoto et al. 1981b). Darüber hinaus wurde heraus gefunden, dass die chaotropen Iodidionen wesentlich durch Sephadex G10 verzögert werden konnten. Die Retention wurde auf "pushing" von Ionen, welche niedrige Ladungsdichte haben, an die schwach hydratisierte neutrale Oberfläche des Säulenmaterials zurückgeführt (Collins 1995). Was Borclusterverbindungen anbelangt, wurden die Wechselwirkungen von $B_{12}H_{12}^{2-}$, $B_{12}H_{11}Cl^{2-}$, $B_{12}H_{11}Br^{2-}$, $1,2-B_{12}H_{10}Cl_2^{2-}$, $1,7-B_{12}H_{10}Cl_2^{2-}$, $1,2-B_{12}H_{10}Br_2^{2-}$, $1,7-B_{12}H_{10}Br_2^{2-}$ und $1,7,9-B_{12}H_9Cl_3^{2-}$ mit Hydroxyethylmethacrylat-Gel (HEMA-Gel) untersucht (Grüner et al. 1991). Die Wechselwirkungen sind bezogen auf Clusterverbindungen unterschiedlich stark, und diese Verbindungen können mit HEMA-Gel getrennt werden.

In dieser Studie wurden die Wechselwirkungen von geladenen Borclusterverbindungen mit den Gelmatrizen, Sephadex G-50, Sephadex G-100, Sepharose 4B und Superdex 200, beobachtet. Sephadex G-50, Sephadex G-100 und Sepharose 4B wechselwirkten mit halogenierten Borclusterverbindungen stark bzw. sehr stark; einige Clusterverbindungen, die lange Kohlenstoffketten besitzen, konnten auch mit diesen Matrizen wechselwirken. Es war besonders auffällig, dass Superdex 200 mit fast allen Borclusterverbindungen stark wechselwirken konnte. Die Retentionen von halogenierten Clusterverbindungen mit steigender Halogenatomgröße und vom BNR_3^- mit vergrößerten R-Gruppen wurden erheblich erhöht. Superdex 200 ist eine Gelmatrix, die in letzter Zeit viel für Immobilisierung von Liposomen, und zwar für ILC, verwendet wird. Superdex 200 hat eventuell kleine Wechselwirkungen mit vielen Arzneimitteln (Johansson et al. 2005 und 2007), aber das gilt nicht für Borclusterverbindungen und manch andere Arzneimittel bzw. chemische Verbindungen. Die Wechselwirkung der Derivate des Hydroborclusters mit hydrophilen HEMA-Gelen zeigt ähnliche Trends wie hier beobachtet. Halogenierte Clusterverbindungen werden stärker als wasserstoffhaltige Clusterverbindungen verzögert. Die Retention erhöht sich von Cl über Br bis I als Substituenten und mit

der Anzahl von Halogenatomen (Grüner et al. 1991).

Zur Zeit kann über die Gründe für die unvermuteten Retentionen von Borclusterverbindungen an diesen organischen Säulenmaterialien spekuliert werden. Bezogen auf eine erscheinende Studie der Molekulardynamik (Karki et al., 2012) ist bekannt geworden, dass die Cluster schlecht von Wasser solvatisierte Ionen sind und die Energie, die notwendig ist, um die Hülle der Hydratisierung abzustreifen, ziemlich klein ist (in Größenordnung von ein paar kJ/mol). Auch Glucose, besonders in Form von β -Pyranose, wechselwirkt nur schwach mit Wasser auf der Fläche des Rings (β -Pyranose hat apolare, axial positionierten C-H-Gruppen und polare, equatorial positionierten Hydroxygruppen. C1-H1, C3-H3 und C5-H5 bilden eine hydrophobe Oberfläche, C2-H2 und C4-H4 bilden eine hydrophobe Unterfläche (Abb. 7.9). Von daher wechselwirkt β -Pyranose nur schwach mit Wasser auf der Fläche des Rings) und die axialen Wasserstoffe werden mit wässriger Lösung konfrontiert (Brady et al, 2012). Es kann daher angenommen werden, dass die Cluster mit den Brücken der Quervernetzung, welche durch Epichlorohydrin in Sephadex eingeführt wurden, wechselwirken könnten (Sephadex G-50 hatte eine stärkere Retention als Sephadex G-100 gezeigt). In Superdex ergeben sich die Strukturen aus der extensiven Quervernetzung von Agarose mit bis-Epoxid und Epichlorohydrin und es wurde angenommen, dass diese Strukturen die bedeutende Retention von phenolischen Verbindungen an Superose verursacht haben (Tan et al. 2010). Daher könnte man die Wechselwirkung von Borclusterverbindungen mit Superdex auf die starke Quervernetzung des Agaroserückgrats zurückführen.

Was die Thermodynamik des chromatographischen Vorgangs betrifft, waren die ΔH° - und die ΔS° -Werte wegen den Wechselwirkungen von Di- bzw. Trihydroxybenzen und Tetraalkylammoniumsalzen mit Sephadexgel bekannt (Haglund et al. 1980 und Ujimoto et al. 1981b). Negative Werte von ΔH° und ΔS° wurden für die Wechselwirkung von Di- und Trihydroxybenzen mit Sephadex G15 beobachtet (Haglund et al. 1980). Im Gegensatz dazu waren ΔH° und ΔS° positiv für die Wechselwirkung von Tetraalkylammoniumsalzen mit Sephadex G10 (Ujimoto et al. 1981b) und die Erhöhung der Entropie wurde auf das Schmelzen von eisförmigen, rund um die Substanz angeordneten, Wassermolekülen beim Wechselwirken mit Sephadex G10 zurückgeführt.

Für die Wechselwirkung von Borclusterverbindungen mit Superdex 200 und Sephadex G-100 wurde gefunden, dass ΔH° und ΔS° negativ waren und es zwischen ΔH° und ΔS° eine starke Korrelation gab. Dementsprechend würde die Ordnung von Wassermolekülen bei den Wechselwirkungen von Clusterverbindungen mit Gelmatrizen zunehmen und die freigesetzte thermische Energie würde fast vollständig durch die zunehmende Ordnung der Wassermoleküle kompensiert. ΔH° -

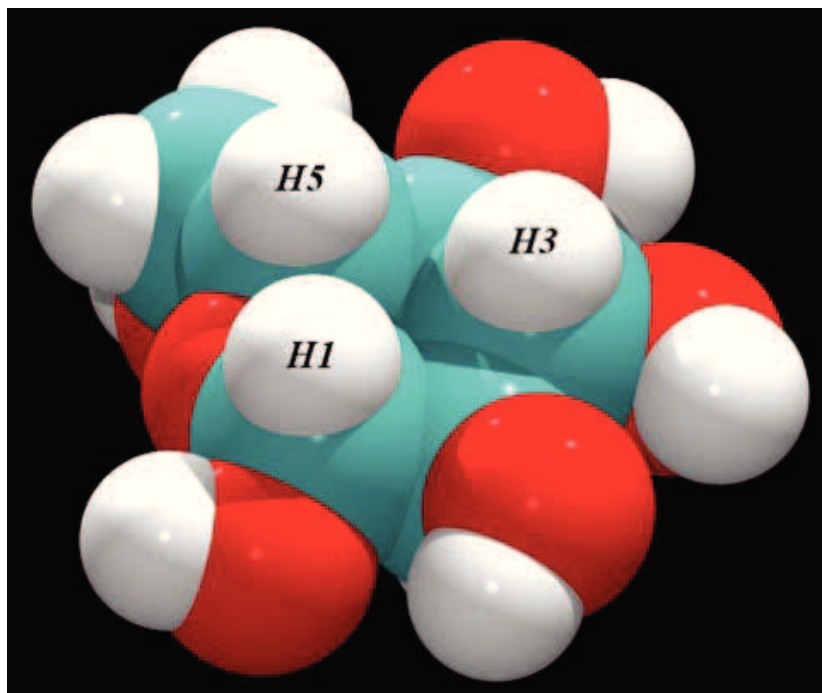


Abb. 7.9 Darstellung eines β -Pyranosemoleküls (van der Waals-Modell). Hydrophobe Oberfläche aus C1-H1, C3-H3 und C5-H5 sowie hydrophobe Unterfläche aus C2-H2 und C4-H4 (Brady et al, 2012).

und ΔS° -Werte, welche aufgrund der Wechselwirkung der unterschiedlichen Clusterderivate mit HEMA-Matrizen zustande gekommen sind, betreffen auch die ΔH° bzw. ΔS° -Werte, welche hier beobachtet wurden. Für $B_{12}H_{11}I^-$ wurde dessen ΔH° bzw. ΔS° , wegen dessen Wechselwirkung mit Separon HEMA-BIO 300, berechnet (Die Daten sind in Abb. 4 von Grüner et al. (1991) zu lesen), ΔS° ist $-56 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{Mol}^{-1}$ und ΔH° $-24.9 \text{ kJ} \cdot \text{Mol}^{-1}$.

Die Wechselwirkungen von $B_{12}H_{12}^{2-}$, $B_{12}Cl_{12}^{2-}$, $B_{12}Br_{12}^{2-}$ und $B_{12}I_{12}^{2-}$ mit Aluminiumoxid wurden auch bei drei Temperaturen untersucht, um die thermodynamischen Daten zu erhalten. Was aber erstaunlich war, dass ein paar unbekannte Signalpeaks im Massenspektrum während den Elutionen aufgetreten waren, z.B 559,3, 592,5, 628,6, 683,7 und 796,9 (Abb. 7.10). Diese Peaks könnten nicht sehr sicher interpretiert werden, eventuell hätten die Wechselwirkungen von Borclusterverbindungen mit Aluminiumoxid zur Modifikation von Borclusterverbindungen geführt. Der genaue Mechanismus konnte nicht erklärt werden, aber die Reproduzierbarkeit der Messung war auf jeden Fall schlecht (Abb. 7.11-Abb. 7.13).

Die Wechselwirkung von Borclusterverbindungen mit kohlenstoffhaltigen Gelmaterialien bzw. mit Alumina lässt die Schlussfolgerung zu, dass diese Gelmaterialien ungeeignet für Chromatographie von diesen Clusterverbindungen sind. In Wirklichkeit ist die Retention so stark, wie z.B an Superdex 200, dass Superdex zur Trennung mancher Clusterverbindungen von anderen Clusterverbindungen verwendet werden kann.

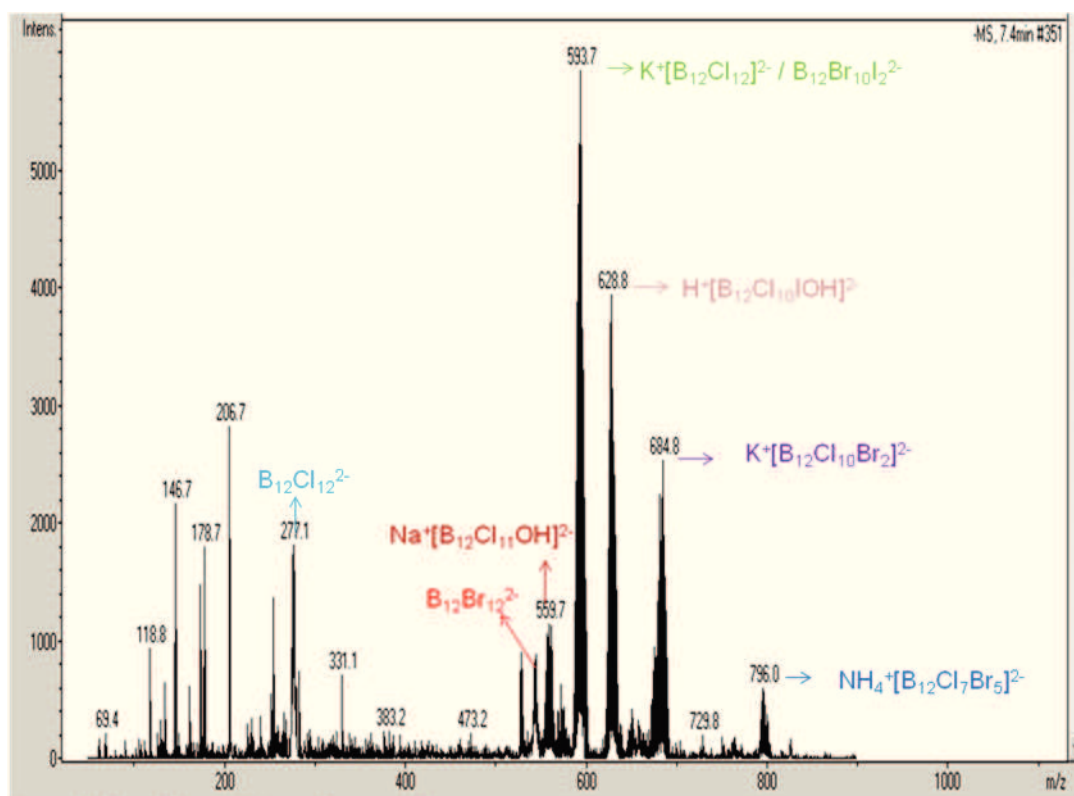


Abb. 7.10 Massenspektrum bei 7,4min während einer Elution von Borclusterverbindungen (Säulenmatrix: Aumina)

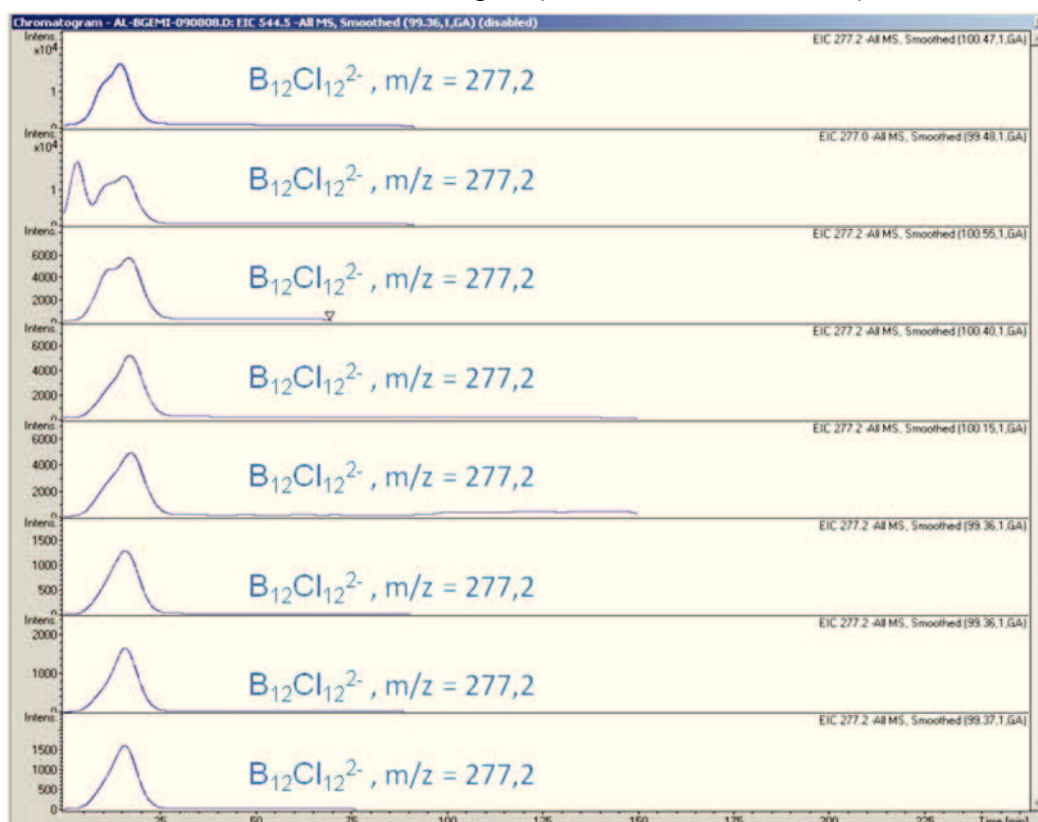


Abb. 7.11 Chromatogramme aufeinander folgender Elutionen von $B_{12}Cl_{12}^{2-}$ (Säulenmatrix: Alumina)

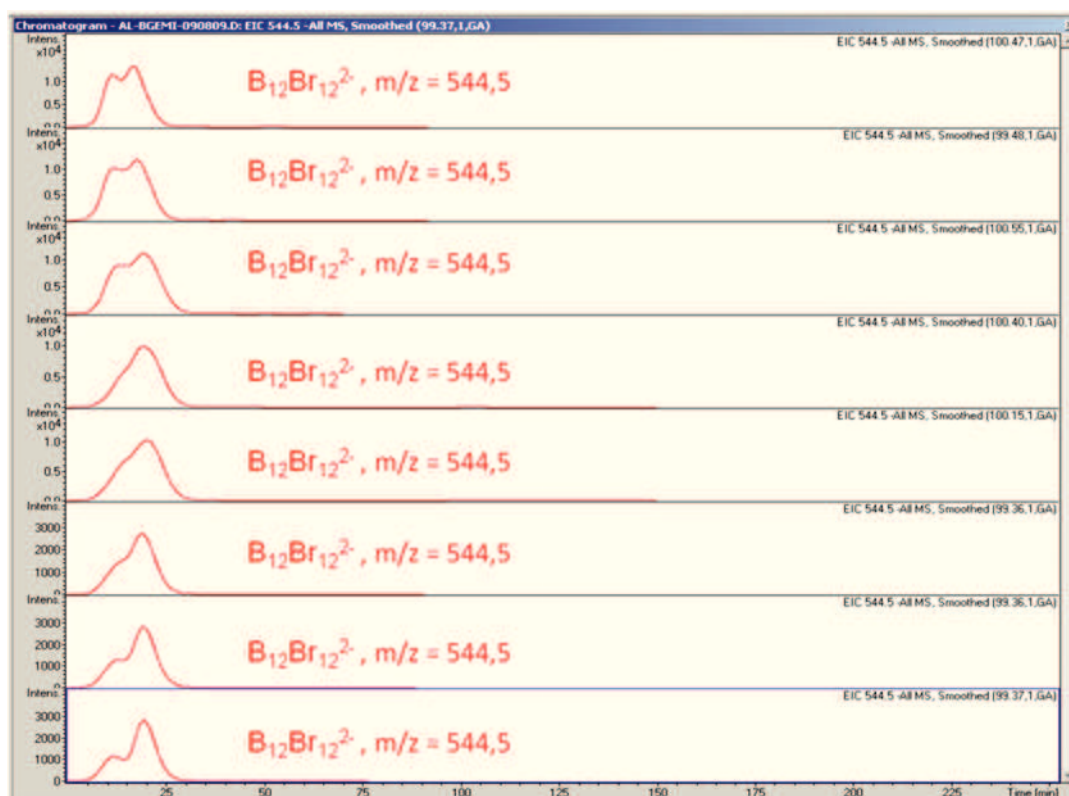


Abb. 7.12 Chromatogramme aufeinander folgender Elutionen von $B_{12}Br_{12}^{2-}$ (Säulenmatrix: Alumina)

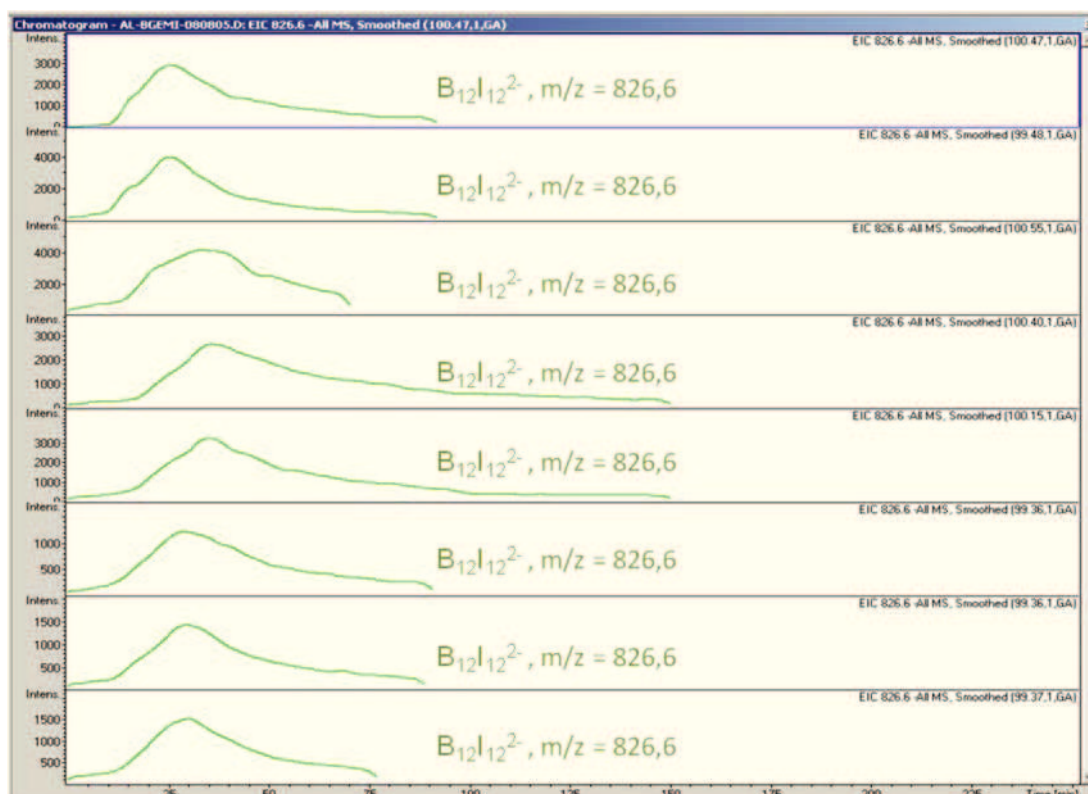


Abb. 7.13 Chromatogramme aufeinander folgender Elutionen von $B_{12}I_{12}^{2-}$ (Säulenmatrix: Alumina)

8. Modifikation von Silicagel

Im letzten Kapitel wurde schon belegt, dass Silicagel den kleinsten Einfluss auf die Retention der Borclusterverbindungen hat. Sofern eine Ähnlichkeit mit Membranen an der Oberfläche des Silicagels geschaffen werden kann, würde dieses Material reizvoll als Säulenmaterial für chromatographische Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Borclusterverbindungen und Membranen sein.

8.1 Ein reizvolles Modell: Silicagel mit kovalent gebundenen Liposomen

Eine Idee ist, Liposomen kovalent an Silicagel zu binden, weil die Retention bezogen auf Silicagel vernachlässigt werden kann, könnte die Retention einer Dodecaboratclusterverbindung auf die Wechselwirkung mit Liposomen zurückzuführen sein.

Abb. 8.1 zeigt den Vorgang der Herstellung von Silicagel mit kovalent gebundenen Liposomen.

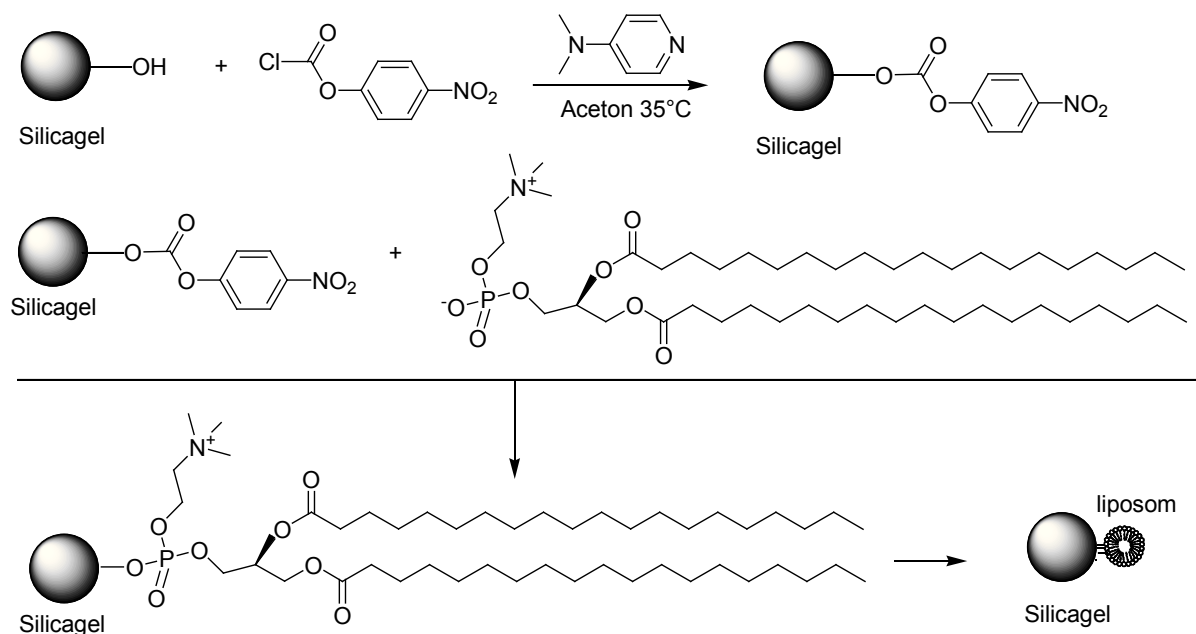


Abb. 8.1 Vorgang zum kovalenten Binden von Liposomen an Silicagel

Um Liposomen kovalent an Silicagel zu binden, müsste aber das Silicagel zuerst vorbehandelt und mit Chloroformat aktiviert werden.

8.1.1 Vorbehandlung des Silicagels

Silicagel (von Fisher Chemicals) wurde unter Rückfluss in einer 20%igen (v/v)

Salzsäure für 4 Stunden gekocht und dann mit einer großen Menge von bidestilliertem Wasser gewaschen, bis der pH-Wert der Waschflüssigkeit ungefähr neutral war. Das Silicagel wurde anschließend unter Vacuum bei 120 °C für ca. 8 Stunden getrocknet.

8.1.2 Aktivierung des Silicagels mit 4-Nitrophenylchloroformat

Nachdem das mit Säure behandelte Silicagel getrocknet war, wurde 4,0 g Gel genommen und in eine Lösung, welche aus 30 mL 100 %igem Aceton und 0,5g 4-Nitrophenylchloroformat (von Acros Organics) bestand, gegeben. Danach wurde 0,339 g (2,48 mmol) Dimethylaminopyridin (von Acros Organics) (56 mM) in das Reaktionsgemisch gegeben. Das Ganze wurde bei 35 °C anderthalb Stunden gerührt und danach abfiltriert. Das erhaltene Gel wurde dann mit Aceton und bidestilliertem Wasser gewaschen und unter Vakuum bei 120 °C getrocknet (Mao et al. 2003).

8.1.3 Kovalente Kopplung von Liposomen ans aktivierte Silicagel

Das mit 4-Nitrophenylchloroformiat aktivierte Silicagel (0,2 g) wurde in 0,75 mL Suspension aus unilamellaren Liposomen gegeben. Die kovalente Kopplungsreaktion lief über Nacht ab (Mao et al. 2003).

Das Lipid, das für die Präparation von Liposomen verwendet wurde, ist Egg-Phosphatidylcholin (EPC). Die Liposomen aus EPC wurden kovalent an das Silicagel gebunden. Dieses Säulenmaterial wurde dann als K-EPC bezeichnet und die Säule, die mit diesem Material gefüllt ist, wurde als K-EPC-Säule genannt.

Das erhaltene Säulenmaterial wurde dann charakterisiert, dafür wurde eine Portion vom getrockneten Säulenmaterial (30 mg) in Schwefelsäure hydrolysiert und die Stoffmenge des Phosphats wurde durch Phosphat-Assay bestimmt (Abschnitt 8.4). Ein Batch des K-EPC-Gel (1 Gram) enthält 0,171 mmol Phosphatidylcholin und ein anderes Batch enthält 0,271 mmol Phosphatidylcholin pro g Gel (Tab. 8.3).

8.2 Modifikation von Silicagel mit unterschiedlichem Anteil des Phosphatidylcholins

Um die Wechselwirkung zwischen Borclusterverbindungen und Membranen noch genauer zu untersuchen, wurde die hauptsächliche Komponente der Membran, Phosphatidylcholin, in den Fokus gestellt. Phosphatidylcholin besteht aus einer hydrophilen Kopfgruppe, einem Glycerol und zwei hydrophoben, langen Kohlenstoffketten (Abb. 8.2 und Abschnitt 2.3). Aufgrund dieser Struktur könnten die hydrophile bzw. elektrostatische Wechselwirkung und die hydrophobe

Wechselwirkung zu der gesamten Wechselwirkung beitragen.

Es ist dann interessant zu wissen, wie stark die oben genannte einzelne Wechselwirkung ist, oder mit anderen Worten, was für eine Rolle die unterschiedlichen Wechselwirkungen spielen.

Auf Basis dieses Gedanken werden die folgenden unterschiedlichen Modifikationen von Silicagel berücksichtigt.

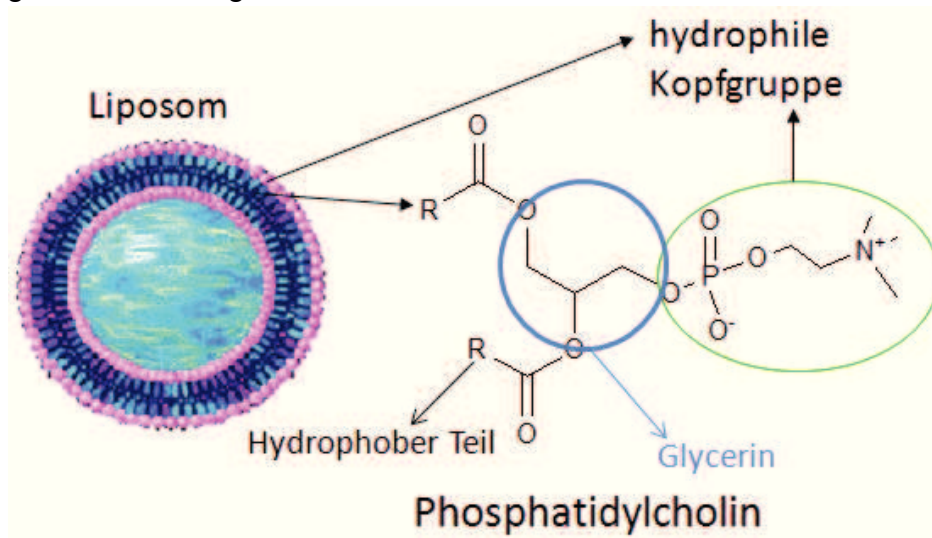


Abb. 8.2 Struktur von Phosphatidylcholin

8.2.1 Kopfgruppe des Phosphatidylcholins mit einem kurzen hydrophoben Schwanz ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$) kovalent an Silicagel gebunden

Die hydrophile Kopfgruppe des Phosphatidylcholins, mit einer kurzen Kohlenstoffkette aus drei $-\text{CH}_2$ Einheiten, wurde kovalent an das Silicagel gebunden. Im Vergleich zu der zweiten Modifikation, wobei nur die Kopfgruppe kovalent an das Silicagel gebunden ist, enthalten die Wechselwirkungen, welche mit diesem Säulenmaterial durchgeführt wurden, außer einem hydrophilen bzw. elektrostatischen Effekt eventuell noch einen hydrophoben Effekt. Nur ist der hydrophobe Teil relativ klein und der Einfluss könnte relativ schwach sein.

Aber eine längere Kohlenstoffkette wurde auch zwischen Silicagel und Kopfgruppe des Phosphatidylcholins eingeschoben, damit der Unterschied bezogen auf die Länge des hydrophoben Teils darzustellen.

Der Herstellungsvorgang dieser Modifikation ist in Abb. 8.3 gezeigt.

Für die Herstellung dieses Säulenmaterials wurde zuerst SiCl -Gel aus Silicagel hergestellt. Dafür sollte Silicagel am Anfang unter einen Fluss von Stickstoff bei $150\text{ }^\circ\text{C}$ 10 Stunden erhitzt werden. Dieser Vorgang wurde als Aktivierung des Silicagels benannt. Das aktivierte Silicagel wurde dann sofort zur Funktionalisierung eingesetzt. Dabei wurde 10,0 g vom aktivierten Silicagel in 50 mL trockenes Toluol

gegeben und suspendiert, anschließend wurde 10,0 mL (54,0 mmol) 3-Chloropropyltrimethoxysilan (von Sigma-Aldrich) (CTS) in die Suspension gegeben. Das Ganze wurde unter Rückfluss und Schutzgas ca. drei Tage gerührt. Danach wurde das Reaktionsgemisch abfiltriert und das Gel wurde mit Toluol gewaschen und unter Vacuum für ein paar Stunden getrocknet. Das neue modifizierte Silicagel wurde als SiCl-Gel bezeichnet (Sales et al. 2004).

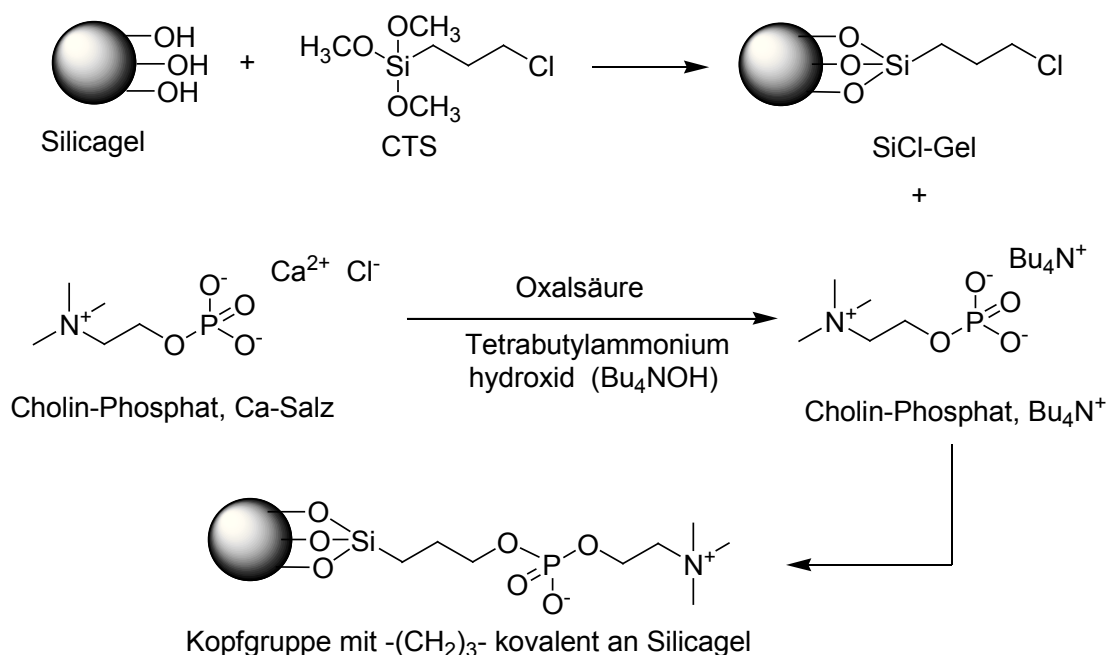


Abb. 8.3 Binden der Kopfgruppe des Phosphatidylcholins inklusive $-(\text{CH}_2)_3-$ an Silicagel

Das SiCl-Gel sollte weiter modifiziert werden, damit das gewünschte Säulenmaterial erhalten werden konnte. Für weitere Modifikation wurde das Tetrabutylammoniumsalz des Cholinphosphats aus dessen Kalziumsalz hergestellt. 1,02 g Kalziumsalz des Cholinphosphats (von Sigma-Aldrich) wurde in ca. 5 mL bidestilliertem Wasser gelöst und die wässrige Lösung aus 0,39 g Oxalsäuredihydrat (von Acros Organics) und 5 mL bidestilliertem Wasser wurde in die vorherige Lösung gegeben. Die milchige Suspension wurde mit Hilfe von einem Membranfilter (Porengröße 0,25 Mikrometer) abfiltriert. Das klare Filtrat wurde mit Tetrabutylammoniumhydroxid (von Acros Organics) bis zu einem pH von 7,4 titriert. Die erhaltene Lösung wurde mit Hilfe eines Rotationsverdampfers abrotiert und der Rest wurde in 5 bis 10 mL Toluol gelöst und wieder abrotiert. Dieser Schritt wurde noch zweimal wiederholt. Das erhaltene gelbliche, ölige Produkt, Tetrabutylammoniumsalz des Cholinphosphats, wurde dann mit P_2O_5 in einem Exsikkator getrocknet (Geilen et al. 1992).

Der letzte Schritt der Herstellung war die Verknüpfung des Cholinphosphats mit

SiCl-Gel. Das Tetrabutylammoniumsalz des Cholinphosphats (3,0 mmol) wurde in 25 mL trockenem Toluol oder eventuell in einer ähnlichen Menge eines Gemischs aus Toluol und Methanol bzw. Toluol und Acetonitril beim Siedepunkt gelöst, 1,3 g SiCl-Gel wurde dann in die Lösung gegeben und das Reaktionsgemisch wurde unter Rückfluss zwei Tage gerührt. Danach wurde es abfiltriert, mit Toluol, Methanol und Diethylether gewaschen und an der Luft getrocknet.

Das erhaltene Säulenmaterial wurde dann charakterisiert, dafür wurde eine Portion vom getrockneten Säulenmaterial (30 mg) in Schwefelsäure hydrolysiert und die Stoffmenge des Phosphats wurde durch Phosphat-Assay bestimmt (Abschnitt 8.4). Zwei Batches dieses Säulenmaterials wurden hergestellt und charakterisiert. Die Stoffmenge der Cholin Kopfgruppen von dem ersten Batch beträgt 0,268 mmol pro g Säulenmaterial (Tab. 8.3).

1 g Säulenmaterial hat eine Oberfläche von 550 m², auf einen Quadratmeter wurde 0,487 µmol verknüpft, das entspricht

$$0,487 \mu\text{mol} \times 10^{-6} \times 6,02 \times 10^{23} = 2,932 \times 10^{17} \text{ Moleküle / m}^2$$

Das heißt, jeder addierte Rest hat eine Fläche von 340 Å². Die Fläche, die ein Lecithinmolekül in einer Membran besitzt, ist 66-77 Å². Von daher beträgt der Deckungsgrad 19,4% - 22,6%.

Die Stoffmenge der Cholin Kopfgruppen von dem zweiten Batch beträgt 0,156 mmol pro g Säulenmaterial.

8.2.2 Nur die Kopfgruppe des Phosphatidylcholins kovalent an Silicagel gebunden

Bei dieser Modifikation wird nur die hydrophile Kopfgruppe des Phosphatidylcholins kovalent an die Oberfläche des Silicagels gebunden. Diese Kopfgruppe enthält einen positiv geladenen Stickstoff und eine Phosphatgruppe. Nach Verknüpfung der ganzen Kopfgruppe mit Silicagel hat die Phosphatgruppe einen negativ geladenen Sauerstoff und der neue gebundene Teil ist neutral.

Die Retentionszeit der Substanzen, welche mit dieser Art von Säulenmaterial gemessen wird, spiegelt hauptsächlich die hydrophile bzw. elektrostatische Wechselwirkung wider.

Der Vorgang vom Binden der Kopfgruppe des Phosphatidylcholins an Silicagel ist in Abb. 8.4 gezeigt.

Um die Kopfgruppe an Silicagel zu binden, es ist notwendig, ein Hilfsmittel zu verwenden. Dichlorodimethylsilan ist dieses Hilfsmittel (Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie, Edited by Meyer, V.R.).

1,2 g Silicagel wurde innerhalb einer Stunde langsam in 4 mL flüssigem

Dichlorodimethylsilan (von Acros Organics), welches in großem molarem Überschuss ist (Durrani et al. 1986), gegeben. Das Ganze wurde unter Fluss von Stickstoff gerührt. Das entstandene HCl wurde zusammen mit Stickstofffluss ins Wasser geleitet, damit das HCl vom Wasser absorbiert wurde, und der Stickstoff durch das Wasser diffundiert. Das Reaktionsgemisch wurde solange gerührt, bis keine Flüssigkeit mehr vorhanden war.

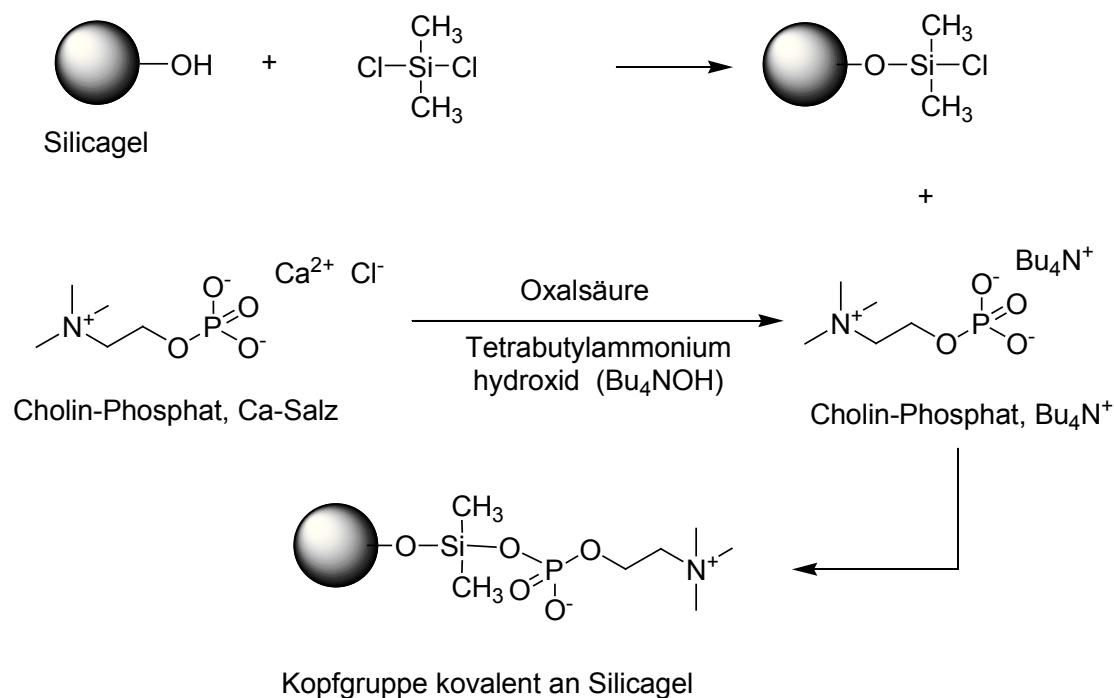


Abb. 8.4 Binden der Kopfgruppe des Phosphatidylcholins an Silicagel

Zur weiteren Modifikation vom neuen erhaltenen Gel wird das Tetrabutylammoniumsalz des Cholinphosphats gebraucht. Dieses Salz wurde wie vorher beschrieben vorbereitet. Das Tetrabutylammoniumsalz des Cholinphosphats (3,0 mmol) wurde in 25 mL trockenem und heißem Toluol gelöst und das vorher neu erhaltene Gelmaterial wurde dann in die Lösung gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde unter Rückfluss zwei Tage gerührt. Danach wurde es abfiltriert und das gewünschte Gelmaterial wurde mit Toluol, Methanol und Diethylether gewaschen und an der Luft getrocknet.

Das erhaltene Säulenmaterial wurde dann charakterisiert, dafür wurde eine Portion vom getrockneten Säulenmaterial (30 mg) in Schwefelsäure hydrolysiert und die Stoffmenge des Phosphats wurde durch Phosphat-Assay bestimmt (Abschnitt 8.4). Zwei Batches dieses Säulenmaterials wurden hergestellt und charakterisiert. Die Stoffmenge der Cholin-kopfgruppen von dem ersten Batch beträgt 0,120 mmol pro g Säulenmaterial (Tab. 8.3).

1 g Säulenmaterial hat eine Oberfläche von 550 m², auf einen Quadratmeter wurde

0,218 μmol verknüpft, das entspricht

$$0,218 \mu\text{mol} \times 10^{-6} \times 6,02 \times 10^{23} = 1,313 \times 10^{17} \text{ Moleküle} / \text{m}^2$$

Das heißt, jeder addierte Rest hat eine Fläche von $761,6 \text{ \AA}^2$. Die Fläche, die ein Lecithinmolekül in einer Membran besitzt, ist $66\text{--}77 \text{ \AA}^2$. Von daher beträgt der Deckungsgrad 8,7% - 10,1%.

Die Stoffmenge der Cholin Kopfgruppen von dem zweiten Batch beträgt 0,076 mmol pro g Säulenmaterial.

8.2.3 Kopfgruppe des Phosphatidylcholins zusammen mit $-\text{C}_3\text{H}_6\text{OC}_6\text{H}_{12}-$ kovalent an Silicagel gebunden

Bei dieser Art von Modifikation befindet sich eine Kette, welche neun $-\text{CH}_2$ Einheiten und dazwischen eine Etherfunktionsgruppe enthält, zwischen Silicagel und Kopfgruppe des Phosphatidylcholins.

Diese Kette ist hydrophob, und die funktionelle Gruppe dazwischen könnte die Wechselwirkung beeinflussen.

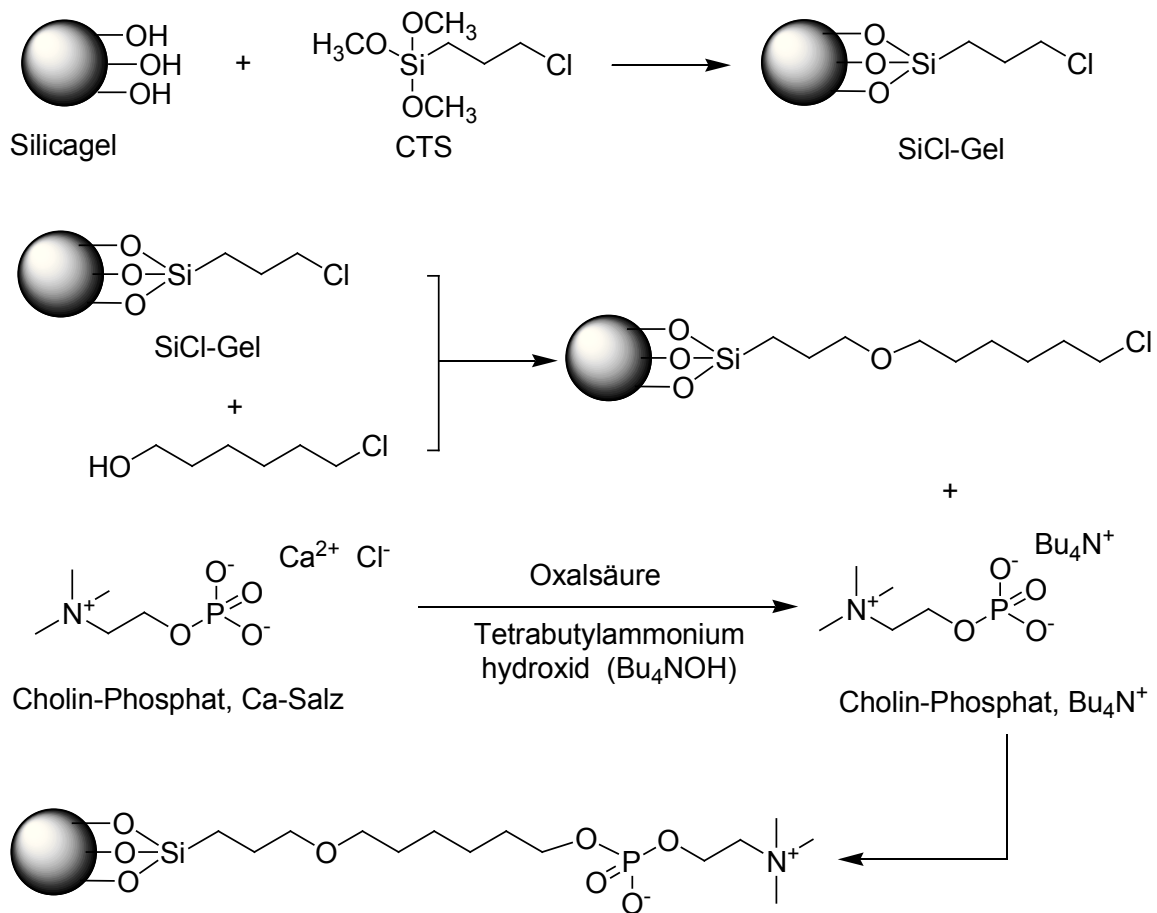
Diese Modifikation (Abb. 8.5) ist die Weiterentwicklung der Modifikation 1 (Abschnitt 8.2.1).

Für diese Art von Modifikation wurde SiCl-Gel gebraucht, die Herstellung des SiCl-Gels wurde bei Modifikation 1 beschrieben. Das SiCl-Gel soll dann nochmal mit 6-Chlorohexanol umgesetzt werden. Dabei wurde 0,5 mL 6-Chlorohexanol (3,75 mmol) in eine Suspension aus 1,2 g SiCl-Gel und 20 mL trockenem Toluol gegeben. Das Ganze wurde zuerst unter Rückfluss über Nacht gerührt und dann wurde nach Zugabe von 0,5 mL Triethylamin (3,59 mmol) weiter für 6 Stunden gekocht.

Das Reaktionsgemisch wurde dann abfiltriert und das neue Gelmaterial mit trockenem Toluol ($3 \times 30 \text{ mL}$) gewaschen und zur weiteren Modifikation gebracht.

Für die weitere Modifikation wurde das Tetrabutylammoniumsalz des Cholinphosphats wie beschrieben vorbereitet. Nach dem Lösen vom Tetrabutylammoniumsalz des Cholinphosphats in 25 mL heißem Toluol wurde das vorher erhaltene Gelmaterial in die Lösung gegeben und das Gemisch wurde unter Rückfluss zwei Tage gerührt. Der pH-Wert des Reaktionssystems wurde mit pH-Papier oder pH-Indikator ab und zu kontrolliert und der Wert war höher als 8. Das heißt, das Reaktionssystem war basisch und für die Deprotonierung der Hydroxygruppe und den nukleophilen Angriff des negativ geladenen Sauerstoffs an den mit Chlor gebundenen Kohlenstoff war eine Zugabe von Base nicht mehr notwendig.

Das gewünschte Säulenmaterial wurde durch Abfiltrieren, Waschen mit Toluol, Methanol und Diethylether erhalten.



Kopfgruppe mit $-\text{C}_3\text{H}_6\text{OC}_6\text{H}_{12}-$ kovalent an Silicagel

Abb. 8.5 Binden der Kopfgruppe des Phosphatidylcholins inklusive $-\text{C}_3\text{H}_6\text{OC}_6\text{H}_{12}-$ an Silicagel

Das erhaltene Säulenmaterial wurde dann charakterisiert, dafür wurde eine Portion vom getrockneten Säulenmaterial (30 mg) in Schwefelsäure hydrolysiert und die Stoffmenge des Phosphats wurde durch Phosphat-Assay bestimmt (Abschnitt 8.4). Zwei Batches dieses Säulenmaterials wurden hergestellt und charakterisiert. Die Stoffmenge der Cholinkopfgruppen von dem ersten Batch beträgt 0,280 mmol pro g Säulenmaterial (Tab. 8.3).

1 g Säulenmaterial hat eine Oberfläche von 550 m^2 , auf einen Quadratmeter wurde $0,509 \text{ } \mu\text{mol}$ verknüpft, das entspricht

$$0,509 \text{ } \mu\text{mol} \times 10^{-6} \times 6,02 \times 10^{23} = 3,065 \times 10^{17} \text{ Moleküle / m}^2$$

Das heißt, jeder addierte Rest hat eine Fläche von $326,3 \text{ } \text{\AA}^2$. Die Fläche, die ein Lecithinmolekül in einer Membran besitzt, ist $66\text{--}77 \text{ } \text{\AA}^2$. Von daher beträgt der Deckungsgrad 20,2% - 23,6%.

Die Stoffmenge der Cholinkopfgruppen von dem zweiten Batch beträgt 0,214 mmol pro g Säulenmaterial.

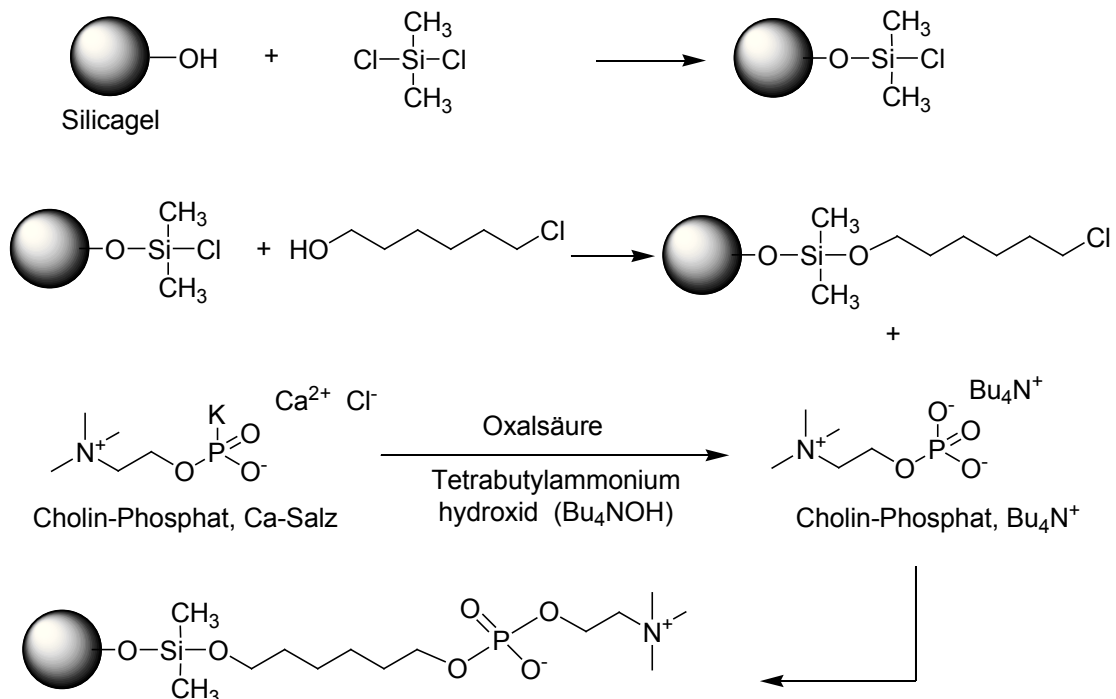
8.2.4 Kopfgruppe des Phosphatidylcholins mit einem längeren hydrophoben Schwanz, $-\text{C}_6\text{H}_{12}-$, kovalent an Silicagel gebunden

Wie schon erwähnt, ist es notwendig, eine längere Kohlenstoffkette zwischen Silicagel und Kopfgruppe anzuschließen. Bei der 1. Modifikation (Abschnitt 8.2.1) war ein hydrophober Teil aus drei Methylengruppen dazwischen, hier wurde ein hydrophober Teil aus sechs Methylengruppen, welcher die doppelte Länge hat, eingebaut.

Die unterschiedliche Länge des hydrophoben Anteils sollte auch eine Rolle spielen. Längere Ketten sollten mehr zur lipophilen Wechselwirkungen beitragen. Die Untersuchung durch diesen Unterschied machte es möglich, die Wechselwirkungen genauer und besser zu verstehen.

Diese Modifikation (Abb. 8.6) ist die Entwicklung von Modifikation 2, zudem ist diese vergleichbar mit Modifikation 3. Mit anderen Worten sind Modifikationen 3 und 4 eine ähnliche Idee.

Wie erwähnt, aufgrund der Basis der Modifikation 2 wurde zuerst Silicagel mit Dichlorodimethylsilan umgesetzt. Das neue Gelmaterial, welches $-\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{Cl}$ an der Oberfläche des Silicagels enthält, sollte weiter durch Reaktion mit 6-Chlorohexanol modifiziert werden. Dabei wurde 0,5mL 6-Chlorohexanol (3,75mmol) in eine



Kopfgruppe mit $-\text{C}_6\text{H}_{12}-$ kovalent an Silicagel

Abb. 8.6 Binden der Kopfgruppe des Phosphatidylcholins inklusive $-\text{C}_6\text{H}_{12}-$ an Silicagel

Suspension aus 1,2g Gelmaterial und 20 mL trockenem Toluol gegeben. Das Ganze wurde unter Rückfluss einen Tag gerührt.

Das Reaktionsgemisch wurde dann abfiltriert und das Gelmaterial wurde mit trockenem Toluol (3 × 30 mL) gewaschen und zur weiteren Modifikation gebracht.

Für die weitere Modifikation wurde das Tetrabutylammoniumsalz des Cholinphosphats wie beschrieben vorbereitet. Nach dem Lösen des Tetrabutylammoniumsalzes des Cholinphosphats in 25 mL heißem Toluol wurde das vorher erhaltene Gelmaterial in die Lösung gegeben und das Gemisch wurde unter Rückfluss zwei Tage gerührt.

Das gewünschte Säulenmaterial wurde durch Abfiltrieren, Waschen mit Toluol, Methanol und Diethylether erhalten.

Das erhaltene Säulenmaterial wurde dann charakterisiert, dafür wurde eine Portion vom getrockneten Säulenmaterial (30 mg) in Schwefelsäure hydrolysiert und die Stoffmenge des Phosphats wurde durch Phosphat-Assay bestimmt (Abschnitt 8.4). Zwei Batches dieses Säulenmaterials wurden hergestellt und charakterisiert. Die Stoffmenge der Cholin Kopfgruppen von dem ersten Batch beträgt 0,095 mmol pro g Säulenmaterial (Tab. 8.3).

1 g Säulenmaterial hat eine Oberfläche von 550 m², auf einen Quadratmeter wurde 0,173 µmol verknüpft, das entspricht

$$0,173 \mu\text{mol} \times 10^{-6} \times 6,02 \times 10^{23} = 1,041 \times 10^{17} \text{ Moleküle} / \text{m}^2$$

Das heißt, jeder addierte Rest hat eine Fläche von 960,6 Å². Die Fläche, die ein Lecithinmolekül in einer Membran besitzt, ist 66-77 Å². Von daher beträgt der Deckungsgrad 6,9% - 8,0%.

Die Stoffmenge der Cholin Kopfgruppen von dem zweiten Batch beträgt 0,0893 mmol pro g Säulenmaterial.

8.2.5 Diskussion der Modifikationen

Bei den oben beschriebenen Modifikationen wurde immer dieselbe Menge vom Tetrabutylammoniumsalz des Cholinphosphats, nämlich 3,0 mmol, verwendet. Dementsprechend wurde ca. 1,2-1,3 g SiCl-Gel oder andere Zwischengelmaterialien zur Modifikation gebracht. Das Verhältnis beträgt 2,3 mmol / g Gelmaterial.

Warum dieses Verhältnis gewählt wurde, ist auf die Menge einiger kommerziell erhältlicher Gelmaterialien, welche sich auch auf die Modifikation des Silicagels beziehen, zurückzuführen. Diese Gelmaterialien sind 3-chloropropylfunktionalisiertes Silicagel, 3-aminofunktionalisiertes Silicagel und octadecylfunktionalisiertes Silicagel. Für 3-chloropropylfunktionalisiertes Silicagel beträgt der Anteil der funktionalisierten

Gruppen 2.5% (Produktinformation von Sigma-Aldrich). Das bedeutet, von 1 g 3-Chloropropyl funktionalisiertem Silicagel fallen 0,025g des Gewichts auf die $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$ -Gruppe zurück.

Die molare Masse der $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$ -Gruppe ist 77,5 g/mol. Daher kann die funktionalisierte Stoffmenge berechnet werden.

$$n = m / M = 0,025 \text{ g} / 77,5 \text{ (g/mol)} = 0,323 \text{ mmol}$$

So beträgt die Menge der enthaltenen Gruppen 0,323 mmol pro Gramm Gelmaterial. Für 3-aminofunktionalisiertes Silicagel beträgt die Menge der funktionalisierten Gruppen ca. 1 mmol/g Gel (Webseite des Produktes von Sigma-Aldrich).

Für octadecylfunktionalisiertes Silicagel wird der Anteil des Kohlenstoffes in Gewichtsprozent angegeben. Dieser Wert liegt zwischen 16% und 24% (Webseite des Produktes von Sigma-Aldrich). Das bedeutet, dass 0,16 g bis 0,24 g von 1 g octadecylfunktionalisiertem Silicagel auf der Kohlenstoffkette zurückzuführen werden kann.

Die Menge der funktionalisierten Gruppen liegt zwischen

$$n = m / M = 0,16 \text{ g} / 216 \text{ (g/mol)} = 0,741 \text{ mmol/g Gel}$$

und $n = m / M = 0,24 \text{ g} / 216 \text{ (g/mol)} = 1,111 \text{ mmol/g Gel}$

Wenn wir die Menge der funktionalisierten Gruppen sehen, wissen wir, dass sie bei ungefähr 1 mmol/g Gel liegt.

Wir haben das Verhältnis von 2,3 mmol gegen 1g Gel gewählt. Die Menge der zu funktionalisierenden Gruppen ist definitiv im Überschuss. Tatsächlich wird auch nicht so viel Cholinphosphat verknüpft, das haben wir durch Hydrolyse des Gelmaterials und dann durch Phosphat-Assay festgelegt.

8.3 Nomenklatur

Die Materialien, welche durch 4 unterschiedliche Modifikationen erhalten wurden, haben mit dem Phosphatidylcholin zu tun. Wie erwähnt, entweder nur die Kopfgruppe des Phosphatidylcholins oder die Kopfgruppe mit unterschiedlichem hydrophobem Teil sind mit Silicagel verknüpft. Die Gelmaterialien wurden dann als PC-Gel bezeichnet.

Das Material aus der ersten Modifikation wurde 1PC-Gel genannt; analog haben wir 2PC-Gel, 3PC-Gel und 4PC-Gel.

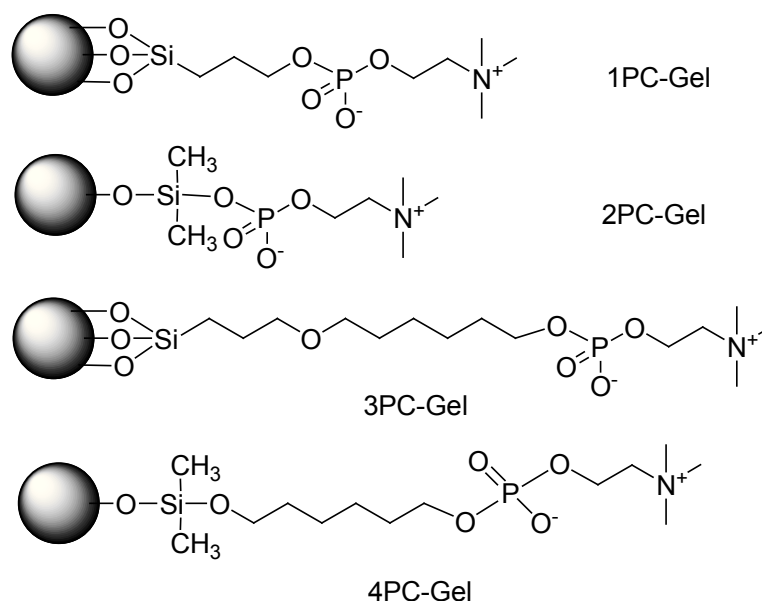


Abb. 8.7 Darstellung von 1, 2, 3 und 4PC-Gel

8.4 Hydrolyse des Säulenmaterials und die Stoffmengebestimmung des Phosphats

Die Stoffmenge des Phosphatidylcholins in K-EPC-gel und die Menge der verknüpften Kopfgruppe (eventuell auch des hydrophoben Teils) kann mit Hilfe von Phosphat-Assay bestimmt werden. Dafür mussten die Säulenmaterialien zuerst hydrolysiert werden.

Eine Portion vom getrockneten Säulenmaterial (30 mg) wurde in ca. 15 mL 1,67 molar Schwefelsäure gegeben. Unter Rückfluss sollte das Ganze über Nacht gerührt werden, dann wurde 1 mL 30%iges H_2O_2 ins Reaktionsgemisch gegeben und weiter 1,5 Stunden gekocht. Danach wurde das Gemisch bei 3000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert und die Flüssigkeit wurde gesammelt. Der Feststoff wurde mit wenig bidestilliertem Wasser gewaschen. Nach Zentrifugieren wurde die Flüssigkeit wieder gesammelt. Die gesamte Flüssigkeit wurde zur Phosphat-Assay gebracht.

8.4.1 Phosphat-Assay

Es handelt sich bei dieser Methode um quantitative Bestimmung des anorganischen Phosphats. Hier wird Perchlorsäure zur Freisetzung von Phosphat benutzt und aus den Phosphationen kann ein farbiger Komplex gebildet werden, der bei 815 nm Absorbanz hat.

8.4.1.1 Laborgeräte und Reagenzien

Reagenzglas (16 × 150 mm, oder 18 × 150 mm); Parafilm; Ölbad;

Thermometer (0 – 350 °C); Wasserbad; Spektrophotometer;

70 % Perchlorsäure; 1 mM Na₂HPO₄ in Wasser

Ammoniummolybdatlösung: 4,4 g Ammoniummolybdat wird in 1,5 L bidestilliertes Wasser gegeben, dann wird 40 mL konzentrierte Schwefelsäure dazu gegeben. Danach wird bidestilliertes Wasser zugegeben, bis das ganze Volumen 2 L beträgt.

Fiske-Subbarow-Lösung: 150 g NaHSO₃ und 5 g Na₂SO₃ werden zu einem Liter bidestillierten Wasser gegeben und anschliessend wird noch 2,5 g 1-Amino-2-naphthol-4-sulfonsäure zugegeben. Das Ganze wird in Dunkelheit bei 40°C 1 bis 2 Stunden gerührt und dann eine ganze Nacht in Dunkelheit bei RT stehen gelassen, danach abfiltrieren. Die Lösung soll in einer braunen Flasche aufbewahrt werden.

8.4.1.2 Durchführung

1. Standardlösung

Tab. 8.1 Pipettierschema von Standardlösung

Nr.	Standardlösun g/μL	Menge/ nmol	Perchlorsäure/mL
1	0	0	0,7
2	50	50	0,7
3	100	100	0,7
4	150	150	0,7
5	200	200	0,7

Jeweils wird 0, 50, 100, 150 und 200 μL Phosphat (aus 1 mM Standardlösung) in ein Reagenzglas gegeben, die entsprechende Stoffmenge von Phosphat beträgt 0, 50, 100, 150 und 200 nmol. Die Absorbanzbestimmung erfolgt doppelt.

- Vorbereitung der Probe: die Stoffmenge des Phosphats soll zwischen 100 und 200 nmol liegen. Das zugegebene Volumen soll nicht mehr als 200 μL sein. 0,7 mL Perchlorsäure soll noch zugegeben werden.
- Standardlösungen und Proben werden in einem Ölbad bei ungefähr 200 °C 1 bis 2 Stunden erhitzt.
- Die Reagenzgläser werden auf RT abgekühlt. Danach werden 0,75 mL Fiske-Subbarow-Lösung und 7 mL Ammoniummolybdatlösung zugegeben. Das Ganze wird vortexiert.

5. Die Reagenzgläser werden nach Schritt 4 in einem kochenden Wasserbad 15 min erhitzt, und dann in einem Wasserbad bis zu RT abkühlt.
6. Bestimmung von Absorption bei 815 nm mit Hilfe eines Spektrophotometers.

8.4.1.3 Eichkurve aus der Standardlösung

Wenn die Absorptionen der verschieden konzentrierten Standardlösungen bei 815 nm gegen die Stoffmenge von Phosphat aufgetragen werden, kann eine Eichkurve erhalten werden. Die Gleichung der Eichkurve kann zur Bestimmung der Konzentration verwendet werden, wenn man die Absorbanz in die Gleichung einsetzt. Die Stoffmenge von Phosphat in der Hydrolyselösung kann damit festgestellt werden.

Tab. 8.2 Beziehung zwischen den Adsorptionen und den Konzentrationen der Na_2HPO_4 - Standardlösung

Probe	Menge nmol	Adsorption 1 bei 815nm	Adsorption 2 bei 815nm	Mittlerer Wert der Adsorption
S0	0	0,0771	0,0753	0,0762
S1	50	0,2446	0,2459	0,2453
S2	100	0,4103	0,4193	0,4148
S3	150	0,5859	0,5785	0,5822
S4	200	0,7457	0,7547	0,7502

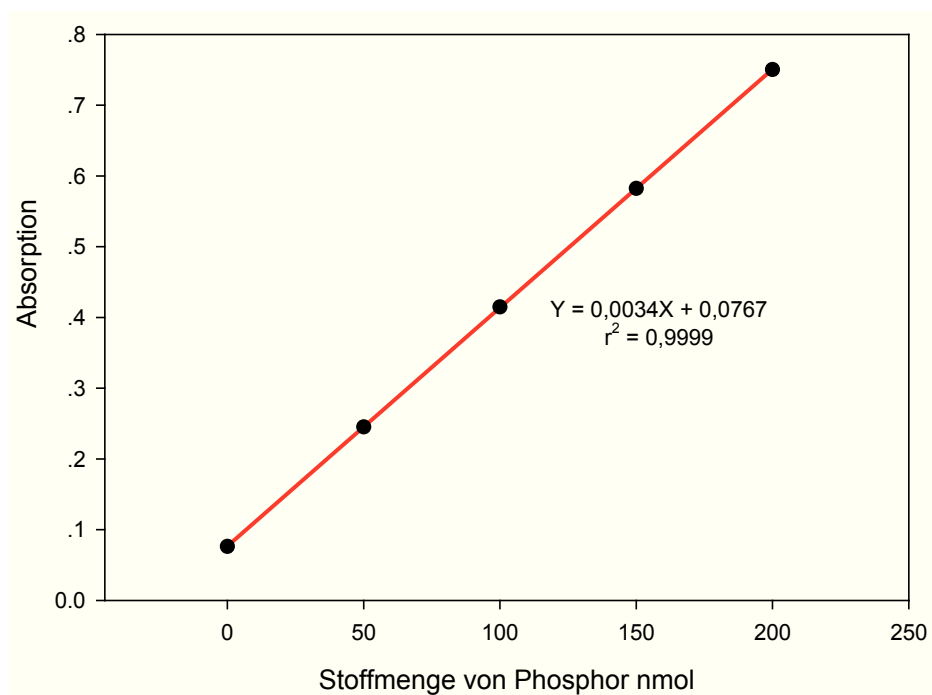


Abb. 8.8 Eichkurve aus der Standardlösung

Tab. 8.3 Liste der durch Modifizierung erhaltenen Gelmaterialien und die Stoffmenge von Phosphat

Gelmaterial	Menge ^c zur Hydrolyse mg	Volumen ^d aus Hydrolyse mL	Pipettivolumen zur P-Assay ^e uL	Absorption1 bei 815nm	Absorption2 bei 815nm	Mittelwert der Absorption	Stoffmenge von Phosphat ^f umol	Stoffmenge pro g Gelmaterial mmol	Gelmaterialmenge in der Säule g	Stoffmenge einer Säule mmol
K-EPC1 ^a	30	24	50	0,1147	0,114	0,1144	5,132	0,171	0,2	0,034
K-EPC2 ^b	30	24	50	0,134	0,1346	0,1343	8,132	0,271	0,15	0,041
1PC	30	20	200	0,3514	0,3483	0,3499	8,034	0,268	0,3	0,080
2PC	30	24	200	0,1738	0,1791	0,1765	3,6	0,120	0,15	0,018
3PC	30	20	200	0,364	0,3614	0,3627	8,412	0,280	0,23	0,064
4PC	30	19	200	0,1776	0,1801	0,1789	2,854	0,095	0,15	0,014

a : Dieses K-EPC-Gel wurde zur Untersuchung von chemischen Verbindungen bzw. Arzneimitteln eingesetzt.

b : Dieses K-EPC-Gel wurde zur Untersuchung von Borclusterverbindungen eingesetzt.

c : Die Menge ist das Gewicht des getrockneten Materials, welches zur Hydrolyse gebracht wird.

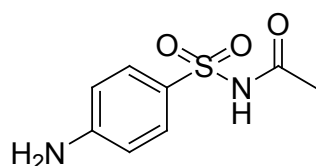
d : Nach Hydrolyse wurde die Flüssigkeit gesammelt, und deren Volumen wurde bestimmt.

e : Um die Stoffmenge von Phosphat zu bestimmen wurde unterschiedliches Volumen der Hydrolyseflüssigkeit zur Analyse pipettiert.

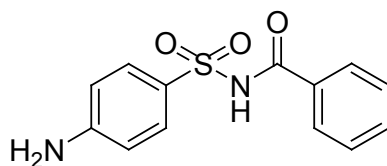
f : Die Stoffmenge wurde mit Hilfe der Eichkurve bestimmt, der Wert hier bedeutet die Stoffmenge in der Hydrolyseflüssigkeit, wobei vorher jeweils 30 mg trockenes Material hydrolysiert wurde.

8.5 Die untersuchten Substanzen

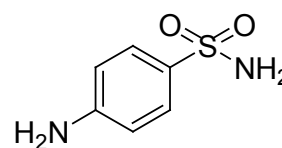
Borclusterverbindungen, die in Tab. 6.1 gelistet sind, wurden auch mit K-EPC-Gel, 1PC-, 2PC-, 3PC- und 4PC-Gel untersucht. Abgesehen davon wurden ca. 20 chemische Verbindungen und Arzneimittel zur Untersuchung eingesetzt. Es sind Salicylsäure, 4-Aminobenzoessäure, 4-Hydroxybenzoessäure, 4-Chlorbenzoessäure, 4-Amino-2-Hydroxybenzoessäure, 4-Brombenzoessäure, Ibuprofen, Ketoprofen, Theophyllin, Diclofenac, 3-Phenylpropionsäure, Sulfacetamid, Sulfabenzamid, Sulfanilamid, Sulfamethoxazol, Sulfamethazin, 4-Hydroxymethylbenzoessäure methylester, 4-Aminoacetphenon, 5-Phenylvaleriansäure, 8-Phenyloktansäure und Mefenaminsäure.



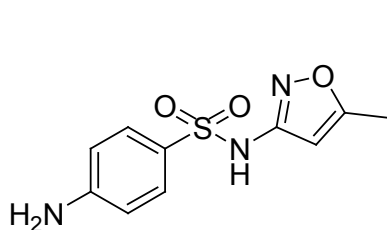
Sulfacetamid



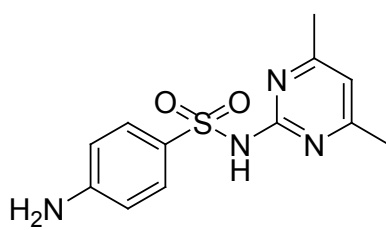
Sulfabenzamid



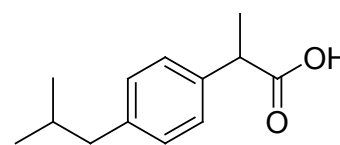
Sulfailamid



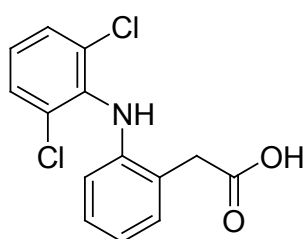
Sulfamethoxazol



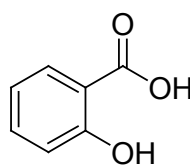
Sulfamethazin



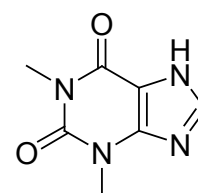
Ibuprofen



Diclofenac



Salicylsäure



Theophyllin

Abb. 8.9 Strukturen von Sulfa-Verbindungen und einigen Arzneimitteln

8.6 Chromatographische Systeme

Für die Messungen der Retentionszeiten von UV-inaktiven Borclusterverbindungen wurde das HPLC-MS-System verwendet. Das System enthält einen Autosampler, zwei Gradientpumpen, einen online-Entgaser und einen Ionenfall-Detektor: Bruker Esquire ESI-MS (Bruker, Germany).

Für UV-aktive chemische Verbindungen und Arzneimittel wurde das System, welches aus einem Merck® L-6200A-Pumpe-System und einem UV-Vis-Detektor L-4250 (Merck-Hitachi Ltd., Tokyo, Japan) besteht, verwendet. Die Wellenlänge wurde auf 220nm eingestellt.

8.7 Untersuchung der verschiedenen mobilen Phase mit Silicagel

Für ILC ist der Tris/HCl-Puffer die übliche mobile Phase und für die Untersuchung der Retentionen von den Borclusterverbindungen bzw. den oben genannten Verbindungen hätte der Tris/HCl-Puffer auch verwendet werden können. Aber wegen der Massenspektrometrie muss man auf den Tris/HCl-Puffer verzichten; Wasser und Ammoniumformiat-Lösung, welche bei der Untersuchung der Retention von Borclusterverbindungen an hydrophilen Säulen (Kapitel 7) verwendet wurde, kamen in Frage.

Die Elutionen von den oben genannten UV-aktiven Substanzen wurden mit Säulen, welche nur aus Silicagel bestanden, und mit drei verschiedenen mobilen Phasen, und zwar 10mM Tris/HCl-Puffer, Wasser und 10mM Ammoniumformiat-Lösung, durchgeführt.

Die Retentionen von den Verbindungen mit unterschiedlichen mobilen Phasen sind in Tab. 8.4-Tab. 8.6 gelistet. Der Vergleich aller k-Werte ist in Tab. 8.7 zu sehen.

Es ist in Abb. 8.10 deutlich zu sehen, dass die k-Werte, welche mit Tris/HCl-Puffer und mit Ammoniumformiat-Lösung erhalten wurden, sehr ähnlich waren. Dagegen waren k-Werte, welche aus Wasser erhalten wurden, unterschiedlich. Von daher kann man sagen, dass die 10mM Ammoniumformiat-Lösung (pH7,4) ein guter Ersatz für den 10mM Tris/HCl-Puffer (pH7,4) war. Eventuell spielt die Ionenstärke eine Rolle bei den Elutionen.

Tab. 8.4 Retentionen von Substanzen an Silicagel mit Tris/HCl-Puffer als mobiler Phase

Probe	Retentionszeit t_{R1} min	Retentionszeit t_{R2} min	Mittelwert t_R min	Flußrate mL/min	Retentions volumen mL	$t_R - t_0$	$V_R - V_0$	$k = (V_R - V_0)/V_0$
$K_2Cr_2O_7$	1,57	1,66	1,62	0,50	0,81			
Salicylsäure	1,68	1,74	1,71	0,50	0,86	0,10	0,05	0,06
4-Aminobenzoesäure	1,90	1,95	1,93	0,50	0,96	0,31	0,16	0,19
4-Hydroxybenzoesäure	1,88	1,79	1,84	0,50	0,92	0,22	0,11	0,14
4-Chlorobenzoesäure	1,74	1,74	1,74	0,50	0,87	0,13	0,06	0,08
4-Amino-2-hydroxybenzoesäure	1,82	1,83	1,83	0,50	0,91	0,21	0,11	0,13
4-Bromobenzoesäure	1,80	1,77	1,79	0,50	0,89	0,17	0,09	0,11
Ibuprofen	1,91	1,78	1,85	0,50	0,92	0,23	0,12	0,14
Ketoprofen	2,05	1,98	2,02	0,50	1,01	0,40	0,20	0,25
Theophyllin	1,94	1,94	1,94	0,50	0,97	0,33	0,16	0,20
Diclofenac	1,83	1,80	1,82	0,50	0,91	0,20	0,10	0,12
3-Phenylpropionsäure	1,84	1,78	1,81	0,50	0,91	0,20	0,10	0,12
Sulfacetamid	1,74	1,74	1,74	0,50	0,87	0,13	0,06	0,08
Sulfabenzamid	1,77	1,72	1,75	0,50	0,87	0,13	0,07	0,08
Sulfanilamid	1,89	1,82	1,86	0,50	0,93	0,24	0,12	0,15
Sulfamethoxazol	1,80	1,76	1,78	0,50	0,89	0,17	0,08	0,10
Sulfamethazin	2,50	2,58	2,54	0,50	1,27	0,93	0,46	0,57
4-Hydroxymethylbenzoesäuremethylester	2,06	2,05	2,06	0,50	1,03	0,44	0,22	0,27
4-Aminoacetophenon	2,09	2,10	2,10	0,50	1,05	0,48	0,24	0,30

Tab. 8.5 Retentionen von Substanzen an Silicagel mit Wasser als mobiler Phase

Probe	Retentionszeit t_{R1} min	Retentionszeit t_{R2} min	Mittelwert t_R min	Flußrate mL/min	Retentions volumen mL	$t_R - t_0$	$V_R - V_0$	$k = (V_R - V_0)/V_0$
$K_2Cr_2O_7$	1,28	1,23	1,26	0,50	0,63			
Salicylsäure	1,34	1,38	1,36	0,50	0,68	0,11	0,05	0,08
4-Aminobenzoessäure	1,56	1,54	1,55	0,50	0,78	0,30	0,15	0,24
4-Hydroxybenzoessäure	1,48	1,80	1,64	0,50	0,82	0,39	0,19	0,31
4-Chlorobenzoessäure	1,79	1,80	1,80	0,50	0,90	0,54	0,27	0,43
4-Amino-2-hydroxybenzoessäure	1,22	1,22	1,22	0,50	0,61	-0,03	-0,02	-0,03
4-Bromobenzoessäure	1,75	1,80	1,78	0,50	0,89	0,52	0,26	0,41
Ibuprofen	1,82	1,90	1,86	0,50	0,93	0,61	0,30	0,48
Ketoprofen	1,79	1,80	1,80	0,50	0,90	0,54	0,27	0,43
Theophyllin	2,04	1,92	1,98	0,50	0,99	0,73	0,36	0,58
Diclofenac	1,94	1,96	1,95	0,50	0,98	0,70	0,35	0,55
3-Phenylpropionsäure	1,75	1,78	1,77	0,50	0,88	0,51	0,26	0,41
Sulfacetamid	1,80	1,80	1,80	0,50	0,90	0,55	0,27	0,43
Sulfabenzamid	1,81	1,83	1,82	0,50	0,91	0,57	0,28	0,45
Sulfanilamid	1,77	1,76	1,77	0,50	0,88	0,51	0,26	0,41
Sulfamethoxazol	1,86	1,86	1,86	0,50	0,93	0,61	0,30	0,48
Sulfamethazin	1,73	1,74	1,74	0,50	0,87	0,48	0,24	0,38
4-Hydroxymethylbenzoesäuremethylester	1,92	1,92	1,92	0,50	0,96	0,67	0,33	0,53
4-Aminoacetophenon	1,99	2,02	2,01	0,50	1,00	0,75	0,38	0,60

Tab. 8.6 Retentionen von Substanzen an Silicagel mit Ammoniumformiat-Lösung als mobiler Phase

Probe	Retentionszeit t_{R1} min	Retentionszeit t_{R2} min	Mittelwert t_R min	Flußrate mL/min	Retentions volumen mL	$t_R - t_0$	$V_R - V_0$	$k = (V_R - V_0)/V_0$
$K_2Cr_2O_7$	1,28	1,27	1,28	0,50	0,64			
Salicylsäure	1,42	1,42	1,42	0,50	0,71	0,15	0,07	0,11
4-Aminobenzoessäure	1,42	1,54	1,48	0,50	0,74	0,21	0,10	0,16
4-Hydroxybenzoessäure	1,48	1,57	1,53	0,50	0,76	0,25	0,13	0,20
4-Chlorobenzoessäure	1,43	1,42	1,43	0,50	0,71	0,15	0,08	0,12
4-Amino-2-hydroxybenzoessäure	1,54	1,36	1,45	0,50	0,73	0,18	0,09	0,14
4-Bromobenzoessäure	1,48	1,39	1,44	0,50	0,72	0,16	0,08	0,13
Ibuprofen	1,46	1,40	1,43	0,50	0,72	0,16	0,08	0,12
Ketoprofen	1,48	1,35	1,42	0,50	0,71	0,14	0,07	0,11
Theophyllin	1,99	1,89	1,94	0,50	0,97	0,67	0,33	0,52
Diclofenac	1,63	1,34	1,49	0,50	0,74	0,21	0,11	0,16
3-Phenylpropionsäure	1,38	1,44	1,41	0,50	0,71	0,14	0,07	0,11
Sulfacetamid	1,41	1,36	1,39	0,50	0,69	0,11	0,06	0,09
Sulfabenzamid	1,42	1,34	1,38	0,50	0,69	0,11	0,05	0,08
Sulfanilamid	1,84	1,62	1,73	0,50	0,87	0,46	0,23	0,36
Sulfamethoxazol	1,42	1,30	1,36	0,50	0,68	0,09	0,04	0,07
Sulfamethazin	2,02	1,82	1,92	0,50	0,96	0,65	0,32	0,51
4-Hydroxymethylbenzoessäuremethylester	1,89	1,84	1,87	0,50	0,93	0,59	0,30	0,46
4-Aminoacetophenon	1,93	1,87	1,90	0,50	0,95	0,63	0,31	0,49

Tab. 8.7 Vergleich der k-Werte aus Tab. 8.4, Tab. 8.5 und Tab. 8.6

Probe	k _{Tris}	k _{Wasser}	k _{AF}
Salicylsäure	0,06	0,08	0,11
4-Aminobenzoesäure	0,19	0,24	0,16
4-Hydroxybenzoesäure	0,14	0,31	0,20
4-Chlorbenzoesäure	0,08	0,43	0,12
4-Amino-2-hydroxybenzoesäure	0,13	0,00	0,14
4-Bromobenzoesäure	0,11	0,41	0,13
Ibuprofen	0,14	0,48	0,12
Ketoprofen	0,25	0,43	0,11
Theophyllin	0,20	0,58	0,52
Diclofenac	0,12	0,55	0,16
3-Phenylpropionsäure	0,12	0,41	0,11
Sulfacetamid	0,08	0,43	0,09
Sulfabenzamid	0,08	0,45	0,08
Sulfanilamid	0,15	0,41	0,36
Sulfamethoxazol	0,10	0,48	0,07
Sulfamethazin	0,57	0,38	0,51
4-Hydroxymethylbenzoesäuremethylester	0,27	0,53	0,46
4-Aminoacetophenon	0,30	0,60	0,49

8.8 Ergebnisse der Messungen und Diskussion

Die Retentionszeiten, Retentionsvolumina und logk_s-Werte von allen Borclusterverbindungen und den oben genannten chemischen Verbindungen bzw. Arzneimitteln sind in Tab. 8.8 – Tab. 8.17 gelistet. Die A-Werte von K-EPC-, 1PC-, 2PC-, 3PC- und 4PC-Säule sind in Tab. 8.3 zu finden.

Die logk_s-Werte von Borclusterverbindungen wurden, bezogen auf unterschiedlichen Gelmaterialien, verglichen und sind in Abb. 8.11 gezeigt. Die Vergleiche von logk_s-Werten der chemischen Verbindungen und Arzneimittel sind in Abb. 8.12a gezeigt. Abb. 8.12b zeigt die Vergleiche der Retentionen von einigen chemischen Verbindungen und Arzneimitteln, deren logk_s-Werte an manchen Gelmaterialien negativ waren.

Es ist in Abb. 8.11 deutlich zu sehen, dass alle der höchsten logk_s-Werte von Borclusterverbindungen bei K-EPC aufgetreten sind. Das heißt, diese Verbindungen haben die längeren Retentionen in einer K-EPC-Säule als in einer 1PC-, 2PC-, 3PC- oder 4PC-Säule, wenn die Stoffmenge von Phosphatidylcholin gleich ist; mit anderen Worten ist die Wechselwirkung zwischen diesen Borclusterverbindungen

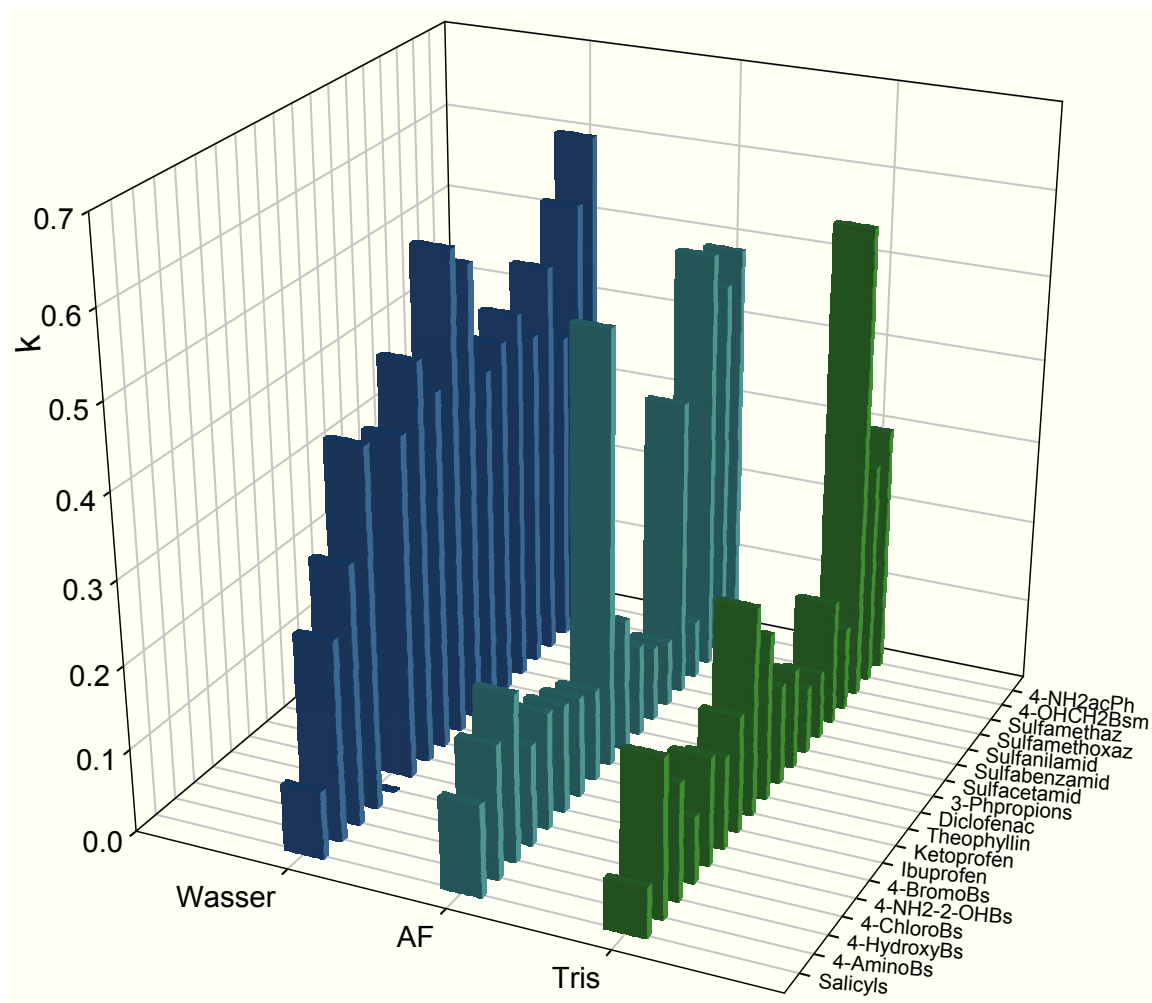


Abb. 8.10 Vergleich der k-Werte (gemessen mit Silicagel und drei mobilen Phasen)

und EPC-Liposomen am stärksten. Die log_k-Werte bei 2PC-Gel und 4PC-Gel haben den zweiten und dritten Platz besetzt, gefolgt von den log_k-Werten bei 3PC-Gel und 1PC-Gel. Wenn man den Vergleich, bezogen auf einzelne Borclusterverbindung, durchführt, gibt es folgende Schlußfolgerungen:

1. Derivatisierung von Dodecahydrododecaborat mit einer Kohlenstoffkette verlängert die Retention der Verbindung,
2. Die Substitution des Wasserstoffs der Thiolgruppe von BSH mit einer Kohlenstoffkette verlängert die Retention der Substanz, besonders wenn eine zweite Kohlenstoffkette mit Schwefel verknüpft wird.

Tab. 8.8 Messergebnisse von chemischen Verbindungen und Arzneimitteln mit K-EPC1

Probe	Retentionszeit t_{R1} min	Retentionszeit t_{R2} min	Mittelwert t_R min	Flußrate mL/min	Retention svolumen mL	$t_R - t_0$	$V_R - V_0$	$k_s = (V_R - V_0)/A$	log k_s
$K_2Cr_2O_7$	1,23	1,23	1,23	0,50	0,62				
Salicylsäure	1,32	1,32	1,32	0,50	0,66	0,09	0,05	1,32	0,12
4-Aminobenzoessäure	1,28	1,26	1,27	0,50	0,64	0,04	0,02	0,59	-0,23
4-Hydroxybenzoessäure	1,27	1,26	1,27	0,50	0,63	0,04	0,02	0,51	-0,29
4-Chlorobenzoessäure	1,36	1,36	1,36	0,50	0,68	0,13	0,07	1,91	0,28
4-Amino-2-hydroxybenzoessäure	2,62	2,68	2,65	0,50	1,33	1,42	0,71	20,88	1,32
4-Bromobenzoessäure	1,42	1,43	1,43	0,50	0,71	0,20	0,10	2,87	0,46
Ibuprofen	2,81	2,98	2,90	0,50	1,45	1,67	0,83	24,49	1,39
Ketoprofen	1,72	1,78	1,75	0,50	0,88	0,52	0,26	7,65	0,88
Theophyllin	1,87	1,84	1,86	0,50	0,93	0,63	0,31	9,19	0,96
Diclofenac	16,04	17,95	17,00	0,50	8,50	15,77	7,88	231,84	2,37
3-Phenylpropionsäure	1,34	1,32	1,33	0,50	0,67	0,10	0,05	1,47	0,17
Sulfacetamid	1,28	1,28	1,28	0,50	0,64	0,05	0,03	0,74	-0,13
Sulfabenzamid	1,34	1,35	1,35	0,50	0,67	0,12	0,06	1,69	0,23
Sulfanilamid	2,04	2,04	2,04	0,50	1,02	0,81	0,41	11,91	1,08
Sulfamethoxazol	1,50	1,52	1,51	0,50	0,76	0,28	0,14	4,12	0,61
Sulfamethazin	2,44	2,53	2,49	0,50	1,24	1,26	0,63	18,46	1,27
4-Hydroxymethylbenzoessäure methylester	3,91	3,97	3,94	0,50	1,97	2,71	1,36	39,85	1,60
4-Aminoacetophenon	3,04	3,07	3,06	0,50	1,53	1,83	0,91	26,84	1,43
5-Phenylvaleriansäure	1,54	1,56	1,55	0,50	0,78	0,32	0,16	4,71	0,67
8-Phenyl oktansäure	7,86	8,78	8,32	0,50	4,16	7,09	3,55	104,26	2,02
Mefenaminsäure	22,82	25,10	23,96	0,50	11,98	22,73	11,37	334,26	2,52

Tab. 8.9 Messergebnisse von Borclusterverbindungen mit K-EPC2

Probe	Retentionszeit min	Flußrate mL/min	$K_s=(V_R-V_0)/A$ A=0,0407 mmol	logKs	Retentionszeit min	Retentionszeit min	Mittelwert min	Flußrate mL/min	$K_s=(V_R-V_0)/A$ A=0,0813 mmol	logKs	Mittelwert logks
K2Cr2O7	1,18	0,40			3,02	3,02	3,02	0,20			
Na2B12H12	2,00	0,40	8,11	0,91	4,60	4,80	4,70	0,20	20,66	1,32	1,11
Na2B12H11phCH3	27,00	0,40	253,81	2,40	92,40	71,00	81,70	0,20	967,77	2,99	2,70
NaBNH3	2,55	0,40	13,51	1,13	5,40	5,40	5,40	0,20	29,27	1,47	1,30
NaBNMe3	12,00	0,40	106,39	2,03	23,70	21,70	22,70	0,20	242,07	2,38	2,21
NaBNEt3	88,50	0,40	858,23	2,93	266,70	280,00	273,35	0,20	3325,09	3,52	3,23
NaBNH2CH2ph	55,40	0,40	532,92	2,73	138,00	124,80	131,40	0,20	1579,09	3,20	2,96
NaBNPr3	521,10	0,40	5109,83	3,71	-	-	-	-	-	-	3,71
NaBNEt2(CH2ph)	1302,60	0,40	12790,42	4,11	-	-	-	-	-	-	4,11
Na2BSH	4,50	0,40	32,68	1,51	19,00	18,80	18,90	0,20	195,33	2,29	1,90
NaBSMe2	26,60	0,40	249,88	2,40	56,60	50,70	53,65	0,20	622,76	2,79	2,60
Na2B12Cl12	4,00	0,40	27,76	1,44	15,90	17,70	16,80	0,20	169,50	2,23	1,84
	243,70	0,40	2383,54	3,38	-	-	-	-	-	-	3,38
Na2B12Br12	-	0,40	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Na2B12I12	-	0,40	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Na2B12I11OH	-	0,40	-	-	-	-	-	-	-	-	-

A: Stoffmenge der Phospholipide.

Die Messungen bei der Flußrate von 0,2 mL/min wurden mit einer Säule durchgeführt, diese Säule enthielt doppelt so viel Säulenmaterial als die Säule, welche für die Messungen bei der Flußrate von 0,4 mL/min verwendet wurde.

–: nicht detektiert

Rote Zahl : schlechtes Signal

Tab. 8.10 Messergebnisse von chemischen Verbindungen und Arzneimitteln mit 1PC

Probe	Retentionszeit t_{R1} min	Retentionszeit t_{R2} min	Mittelwert t_R min	Flußrate mL/min	Retention svolumen mL	$t_R - t_0$	$V_R - V_0$	$k_s = (V_R - V_0)/A$	log k_s
$K_2Cr_2O_7$	2,20	2,13	2,17	0,20	0,43				
Salicylsäure	2,52	2,47	2,50	0,20	0,50	0,33	0,07	0,80	-0,10
4-Aminobenzoesäure	2,29	2,24	2,27	0,20	0,45	0,10	0,02	0,24	-0,62
4-Hydroxybenzoesäure	2,31	2,28	2,30	0,20	0,46	0,13	0,03	0,31	-0,50
4-Chlorobenzoesäure	2,44	2,40	2,42	0,20	0,48	0,26	0,05	0,61	-0,21
4-Amino-2-Hydroxybenzoesäure	3,88	4,12	4,00	0,20	0,80	1,84	0,37	4,42	0,65
4-Bromobenzoesäure	2,54	2,46	2,50	0,20	0,50	0,34	0,07	0,81	-0,09
Ibuprofen	2,81	2,74	2,78	0,20	0,56	0,61	0,12	1,47	0,17
Ketoprofen	2,89	2,88	2,89	0,20	0,58	0,72	0,14	1,73	0,24
Theophyllin	3,11	3,13	3,12	0,20	0,62	0,96	0,19	2,30	0,36
Diclofenac	4,34	4,56	4,45	0,20	0,89	2,29	0,46	5,51	0,74
3-Phenylpropionsäure	2,51	2,44	2,48	0,20	0,50	0,31	0,06	0,75	-0,13
Sulfacetamid	2,36	2,27	2,32	0,20	0,46	0,15	0,03	0,36	-0,44
Sulfabenzamid	2,53	2,48	2,51	0,20	0,50	0,34	0,07	0,82	-0,09
Sulfanilamid	3,38	3,47	3,43	0,20	0,69	1,26	0,25	3,04	0,48
Sulfamethoxazol	2,80	2,85	2,83	0,20	0,57	0,66	0,13	1,59	0,20
Sulfamethazin	7,24	8,42	7,83	0,20	1,57	5,67	1,13	13,65	1,14
4-Hydroxymethylbenzoesäure methylester	4,68	5,40	5,04	0,20	1,01	2,88	0,58	6,93	0,84
4-Aminoacetophenon	5,37	6,30	5,84	0,20	1,17	3,67	0,73	8,84	0,95
5-Phenylvaleriansäure	2,64	2,61	2,63	0,20	0,53	0,46	0,09	1,11	0,04
8-Phenylactansäure	3,47	3,38	3,43	0,20	0,69	1,26	0,25	3,04	0,48
Mefenaminsäure	4,88	5,19	5,04	0,20	1,01	2,87	0,57	6,92	0,84

Tab. 8.11 Messergebnisse von Borclusterverbindungen mit 1PC

Probe	Retentionszeit t_{R1} min	Retentionszeit t_{R2} min	Retentionszeit t_{R3} min	Mittelwert t_R min	Flußrate mL/min	Retention svolumen mL	$t_R - t_0$	$V_R - V_0$	$ks = (V_R - V_0)/A$	logks
$K_2Cr_2O_7$	2,03	2,11	2,12	2,09	0,20	0,42				
$Na_2B_{12}H_{12}$	2,65	2,50	2,50	2,55	0,20	0,51	0,46	0,09	1,15	0,06
$Na_2B_{12}H_{11}PhCH_3$	3,00	2,95	3,10	3,02	0,20	0,60	0,93	0,19	2,32	0,36
$NaBNH_3$	2,85	2,90	2,90	2,88	0,20	0,58	0,80	0,16	1,98	0,30
$KBNMe_3$	3,70	3,80	3,75	3,75	0,20	0,75	1,66	0,33	4,14	0,62
$KBNet_3$	5,80	5,45	5,35	5,53	0,20	1,11	3,45	0,69	8,58	0,93
$NaBNH_2CH_2Ph$	3,40	3,35	3,40	3,38	0,20	0,68	1,30	0,26	3,23	0,51
$NaBNPr_3$	10,00	9,30	8,90	9,40	0,20	1,88	7,31	1,46	18,22	1,26
$NaBNet_2(CH_2Ph)$	9,50	8,60	8,50	8,87	0,20	1,77	6,78	1,36	16,89	1,23
Na_2BSH	2,60	2,55	-	2,58	0,20	0,52	0,49	0,10	1,22	0,09
$NaBSMe_2$	3,95	3,80	3,70	3,82	0,20	0,76	1,73	0,35	4,31	0,63
$Na_2B_{12}Cl_{12}$	3,40	3,40	3,40	3,40	0,20	0,68	1,31	0,26	3,27	0,51
$Na_2B_{12}Br_{12}$	3,50	3,60	3,40	3,50	0,20	0,70	1,41	0,28	3,52	0,55
$Na_2B_{12}I_{12}$	4,20	4,30	4,40	4,30	0,20	0,86	2,21	0,44	5,51	0,74
$Na_2B_{12}I_{11}OH$	3,40	3,30	3,60	3,43	0,20	0,69	1,35	0,27	3,35	0,53

A: Stoffmenge der Cholin kopfgruppen

Tab. 8.12 Messergebnisse von chemischen Verbindungen und Arzneimitteln mit 2PC

Probe	Retentionszeit t_{R1} min	Retentionszeit t_{R2} min	Mittelwert t_R min	Flußrate mL/min	Retentions volumen mL	$t_R - t_0$	$V_R - V_0$	$k_s = (V_R - V_0)/A$	log k_s
$K_2Cr_2O_7$	2,13	2,12	2,13	0,20	0,43				
Salicylsäure	2,78	ohne	2,78	0,20	0,56	0,62	0,12	6,41	0,81
4-Aminobenzoesäure	2,33	ohne	2,33	0,20	0,47	0,17	0,03	1,72	0,24
4-Hydroxybenzoesäure	2,30	ohne	2,30	0,20	0,46	0,14	0,03	1,41	0,15
4-Chlorobenzoesäure	2,64	ohne	2,64	0,20	0,53	0,48	0,10	4,95	0,69
4-Amino-2-Hydroxybenzoesäure	3,42	ohne	3,42	0,20	0,68	1,26	0,25	13,07	1,12
4-Bromobenzoesäure	2,73	ohne	2,73	0,20	0,55	0,57	0,11	5,89	0,77
Ibuprofen	8,12	6,14	7,13	0,20	1,43	4,97	0,99	51,72	1,71
Ketoprofen	15,99	11,14	13,57	0,20	2,71	11,40	2,28	118,75	2,07
Theophyllin	4,56	4,07	4,32	0,20	0,86	2,15	0,43	22,40	1,35
Diclofenac	21,92	22,91	22,42	0,20	4,48	20,25	4,05	210,94	2,32
3-Phenylpropionsäure	2,68	ohne	2,68	0,20	0,54	0,52	0,10	5,36	0,73
Sulfacetamid	2,42	ohne	2,42	0,20	0,48	0,26	0,05	2,66	0,42
Sulfabenzamid	2,84	ohne	2,84	0,20	0,57	0,68	0,14	7,03	0,85
Sulfanilamid	3,41	ohne	3,41	0,20	0,68	1,25	0,25	12,97	1,11
Sulfamethoxazol	3,74	ohne	3,74	0,20	0,75	1,58	0,32	16,41	1,22
Sulfamethazin	21,59	15,07	18,33	0,20	3,67	16,17	3,23	168,39	2,23
4-Hydroxymethylbenzoesäure methylester	10,94	8,17	9,56	0,20	1,91	7,39	1,48	76,98	1,89
Aminoacetophenon	8,42	6,51	7,47	0,20	1,49	5,30	1,06	55,21	1,74
5-Phenylvaleriansäure	3,66	3,14	3,40	0,20	0,68	1,24	0,25	12,86	1,11
8-Phenyloctansäure	15,38	10,62	13,00	0,20	2,60	10,84	2,17	112,86	2,05
Mefenaminsäure	26,79	20,43	23,61	0,20	4,72	21,45	4,29	223,39	2,35

Tab. 8.13 Messergebnisse von Borclusterverbindungen mit 2PC

Probe	Retentionszeit t_{R1} min	Retentionszeit t_{R2} min	Mittelwert t_R min	Flußrate mL/min	Retentions volumen mL	$t_R - t_0$	$V_R - V_0$	$ks = (V_R - V_0)/A$	logks
$K_2Cr_2O_7$	2,03	2,05	2,04	0,20	0,41				
$Na_2B_{12}H_{12}$	2,75	2,75	2,75	0,20	0,55	0,71	0,14	7,40	0,87
$Na_2B_{12}H_{11}PhCH_3$	3,25	3,20	3,23	0,20	0,65	1,19	0,24	12,34	1,09
$NaBNH_3$	3,05	3,00	3,03	0,20	0,61	0,99	0,20	10,26	1,01
$KBNMe_3$	4,20	4,20	4,20	0,20	0,84	2,16	0,43	22,50	1,35
$KBNet_3$	8,90	8,50	8,70	0,20	1,74	6,66	1,33	69,38	1,84
$NaBNH_2CH_2Ph$	4,10	4,00	4,05	0,20	0,81	2,01	0,40	20,94	1,32
$NaBNPr_3$	42,60	39,50	41,05	0,20	8,21	39,01	7,80	406,35	2,61
$NaBNet_2(CH_2Ph)$	56,90	56,00	56,45	0,20	11,29	54,41	10,88	566,77	2,75
Na_2BSH	2,80	2,90	2,85	0,20	0,57	0,81	0,16	8,44	0,93
$NaBSMe_2$	4,30	4,25	4,28	0,20	0,86	2,24	0,45	23,28	1,37
$Na_2B_{12}Cl_{12}$	4,00	3,85	3,93	0,20	0,79	1,89	0,38	19,64	1,29
$Na_2B_{12}Br_{12}$	4,90	4,85	4,88	0,20	0,98	2,84	0,57	29,53	1,47
$Na_2B_{12}I_{12}$	15,70	13,90	14,80	0,20	2,96	12,76	2,55	132,92	2,12
$Na_2B_{12}I_{11}OH$	4,90	4,85	4,88	0,20	0,98	2,84	0,57	29,53	1,47

A: Stoffmenge der Cholin Kopfgruppen

Tab. 8.14 Messergebnisse von chemischen Verbindungen und Arzneimitteln mit 3PC

Probe	Retentionszeit t_{R1} min	Retentionszeit t_{R2} min	Mittelwert t_R min	Flußrate mL/min	Retentions volumen mL	$t_R - t_0$	$V_R - V_0$	$k_s = (V_R - V_0)/A$	log k_s
$K_2Cr_2O_7$	2,02	2,15	2,09	0,20	0,42				
Salicylsäure	2,55	2,70	2,63	0,20	0,53	0,54	0,11	1,69	0,23
4-Aminobenzoesäure	2,18	2,20	2,19	0,20	0,44	0,11	0,02	0,33	-0,48
4-Hydroxybenzoesäure	2,14	2,19	2,17	0,20	0,43	0,08	0,02	0,25	-0,60
4-Chlorobenzoesäure	2,34	2,29	2,32	0,20	0,46	0,23	0,05	0,72	-0,14
4-Amino-2-hydroxybenzoesäure	4,18	3,68	3,93	0,20	0,79	1,85	0,37	5,77	0,76
4-Bromobenzoesäure	2,43	2,40	2,42	0,20	0,48	0,33	0,07	1,03	0,01
Theophyllin	3,51	3,47	3,49	0,20	0,70	1,41	0,28	4,40	0,64
Ketoprofen	3,31	2,92	3,12	0,20	0,62	1,03	0,21	3,22	0,51
Ibuprofen	2,89	2,76	2,83	0,20	0,57	0,74	0,15	2,32	0,36
Diclofenac	5,67	5,36	5,52	0,20	1,10	3,43	0,69	10,74	1,03
3-Phenylpropionsäure	2,32	2,28	2,30	0,20	0,46	0,22	0,04	0,67	-0,17
Sulfacetamid	2,22	2,16	2,19	0,20	0,44	0,11	0,02	0,33	-0,48
Sulfabenzamid	2,44	2,45	2,45	0,20	0,49	0,36	0,07	1,13	0,05
Sulfanilamid	3,58	3,29	3,44	0,20	0,69	1,35	0,27	4,23	0,63
Sulfamethoxazol	2,65	2,78	2,72	0,20	0,54	0,63	0,13	1,97	0,29
Sulfamethazin	11,78	10,03	10,91	0,20	2,18	8,82	1,76	27,61	1,44
4-Hydroxymethylbenzoesäure methylester	7,33	6,74	7,04	0,20	1,41	4,95	0,99	15,49	1,19
4-Aminoacetphenon	8,08	7,70	7,89	0,20	1,58	5,81	1,16	18,17	1,26
5-Phenylvaleriansäure	2,63	2,50	2,57	0,20	0,51	0,48	0,10	1,50	0,18
8-Phenylloktansäure	4,34	4,50	4,42	0,20	0,88	2,34	0,47	7,31	0,86
Mefenaminsäure	12,78	8,92	10,85	0,20	2,17	8,77	1,75	27,43	1,44

Tab. 8.15 Messergebnisse von Borclusterverbindungen mit 3PC

Probe	Retentionszeit t_{R1} min	Retentionszeit t_{R2} min	Mittelwert t_R min	Flußrate mL/min	Retentions volumen mL	$t_R - t_0$	$V_R - V_0$	$ks = (V_R - V_0)/A$	logks
$K_2Cr_2O_7$	2,20	2,20	2,20	0,20	0,44				
$Na_2B_{12}H_{12}$	2,60	2,70	2,65	0,20	0,53	0,45	0,09	1,07	0,03
$Na_2B_{12}H_{11}PhCH_3$	3,10	3,10	3,10	0,20	0,62	0,90	0,18	2,14	0,33
$NaBNH_3$	3,00	3,00	3,00	0,20	0,60	0,80	0,16	1,90	0,28
$KBNMe_3$	4,00	3,85	3,93	0,20	0,79	1,73	0,35	4,10	0,61
$KBNEt_3$	7,60	6,60	7,10	0,20	1,42	4,90	0,98	11,65	1,07
$NaBNH_2CH_2Ph$	3,65	3,55	3,60	0,20	0,72	1,40	0,28	3,33	0,52
$NaBNPr_3$	19,80	16,80	18,30	0,20	3,66	16,10	3,22	38,29	1,58
$NaBNEt_2(CH_2Ph)$	27,60	23,00	25,30	0,20	5,06	23,10	4,62	54,93	1,74
Na_2BSH	2,75	2,80	2,78	0,20	0,56	0,58	0,12	1,37	0,14
$NaBSMe_2$	4,25	4,00	4,13	0,20	0,83	1,93	0,39	4,58	0,66
$Na_2B_{12}Cl_{12}$	4,10	3,80	3,95	0,20	0,79	1,75	0,35	4,16	0,62
$Na_2B_{12}Br_{12}$	5,30	4,55	4,93	0,20	0,99	2,73	0,55	6,48	0,81
$Na_2B_{12}I_{12}$	11,60	9,60	10,60	0,20	2,12	8,40	1,68	19,98	1,30
$Na_2B_{12}I_{11}OH$	4,30	4,20	4,25	0,20	0,85	2,05	0,41	4,88	0,69

A: Stoffmenge der Cholinopfgruppen

Tab. 8.16 Messergebnisse von chemischen Verbindungen und Arzneimitteln mit 4PC

Probe	Retentionszeit t_{R1} min	Retentionszeit t_{R2} min	Mittelwert t_R min	Flußrate mL/min	Retentions volumen mL	$t_R - t_0$	$V_R - V_0$	$k_s = (V_R - V_0)/V_0$	log k_s
$K_2Cr_2O_7$	2,09	2,14	2,12	0,20	0,42				
Salicylsäure	2,49	ohne	2,49	0,20	0,50	0,38	0,08	5,24	0,72
4-Aminobenzoesäure	2,21	ohne	2,21	0,20	0,44	0,09	0,02	1,33	0,12
4-Hydroxybenzoesäure	2,18	ohne	2,18	0,20	0,44	0,06	0,01	0,91	-0,04
4-Chlorobenzoesäure	2,28	ohne	2,28	0,20	0,46	0,17	0,03	2,31	0,36
4-Amino-2-hydroxybenzoesäure	2,79	ohne	2,79	0,20	0,56	0,68	0,14	9,44	0,97
4-Bromobenzoesäure	2,31	ohne	2,31	0,20	0,46	0,20	0,04	2,73	0,44
Theophyllin	2,72	ohne	2,72	0,20	0,54	0,61	0,12	8,46	0,93
Ketoprofen	3,30	ohne	3,30	0,20	0,66	1,19	0,24	16,57	1,22
Ibuprofen	3,15	ohne	3,15	0,20	0,63	1,04	0,21	14,48	1,16
Diclofenac	3,60	4,16	3,88	0,20	0,78	1,77	0,35	24,69	1,39
3-Phenylpropionsäure	2,34	ohne	2,34	0,20	0,47	0,23	0,04	3,15	0,50
Sulfacetamid	2,24	ohne	2,24	0,20	0,45	0,13	0,03	1,75	0,24
Sulfabenzamid	2,34	ohne	2,34	0,20	0,47	0,23	0,04	3,15	0,50
Sulfanilamid	2,81	ohne	2,81	0,20	0,56	0,70	0,14	9,72	0,99
Sulfamethoxazol	2,50	ohne	2,50	0,20	0,50	0,39	0,08	5,38	0,73
Sulfamethazin	6,82	7,15	6,99	0,20	1,40	4,87	0,97	68,11	1,83
4-Hydroxymethylbenzoesäuremethylester	3,98	4,06	4,02	0,20	0,80	1,91	0,38	26,64	1,43
4-Aminoacetphenon	3,99	4,04	4,02	0,20	0,80	1,90	0,38	26,57	1,42
5-Phenylvaleriansäure	2,50	ohne	2,50	0,20	0,50	0,39	0,08	5,38	0,73
8-Phenylloktansäure	3,83	ohne	3,83	0,20	0,77	1,72	0,34	23,99	1,38
Mefenaminsäure	3,90	4,61	4,26	0,20	0,85	2,14	0,43	29,93	1,48

A: Stoffmenge der Cholin kopfgruppen

Tab. 8.17 Messergebnisse von Borclusterverbindungen mit 4PC

Probe	Retentionszeit t_{R1} min	Retentionszeit t_{R2} min	Mittelwert t_R min	Flußrate mL/min	Retentions volumen mL	$t_R - t_0$	$V_R - V_0$	$k_s = (V_R - V_0)/A$	log k_s
$K_2Cr_2O_7$	2,15	2,13	2,14	0,20	0,43				
$Na_2B_{12}H_{12}$	2,60	2,70	2,65	0,20	0,53	0,51	0,10	7,13	0,85
$Na_2B_{12}H_{11}PhCH_3$	2,70	2,85	2,78	0,20	0,56	0,64	0,13	8,88	0,95
$NaBNH_3$	2,85	2,80	2,83	0,20	0,57	0,69	0,14	9,58	0,98
$KBNMe_3$	3,25	3,30	3,28	0,20	0,66	1,14	0,23	15,87	1,20
$KBNEt_3$	3,80	3,80	3,80	0,20	0,76	1,66	0,33	23,22	1,37
$NaBNH_2CH_2Ph$	3,30	3,40	3,35	0,20	0,67	1,21	0,24	16,92	1,23
$NaBNPr_3$	8,20	8,00	8,10	0,20	1,62	5,96	1,19	83,36	1,92
$NaBNEt_2(CH_2Ph)$	15,60	15,20	15,40	0,20	3,08	13,26	2,65	185,45	2,27
Na_2BSH	2,60	2,70	2,65	0,20	0,53	0,51	0,10	7,13	0,85
$NaBSMe_2$	3,40	3,35	3,38	0,20	0,68	1,24	0,25	17,27	1,24
$Na_2B_{12}Cl_{12}$	3,20	3,20	3,20	0,20	0,64	1,06	0,21	14,83	1,17
$Na_2B_{12}Br_{12}$	3,80	3,60	3,70	0,20	0,74	1,56	0,31	21,82	1,34
$Na_2B_{12}I_{12}$	6,00	ohne	6,00	0,20	1,20	3,86	0,77	53,99	1,73
$Na_2B_{12}H_{11}OH$	3,60	3,70	3,65	0,20	0,73	1,51	0,30	21,12	1,32

A: Stoffmenge der Cholin Kopfgruppen

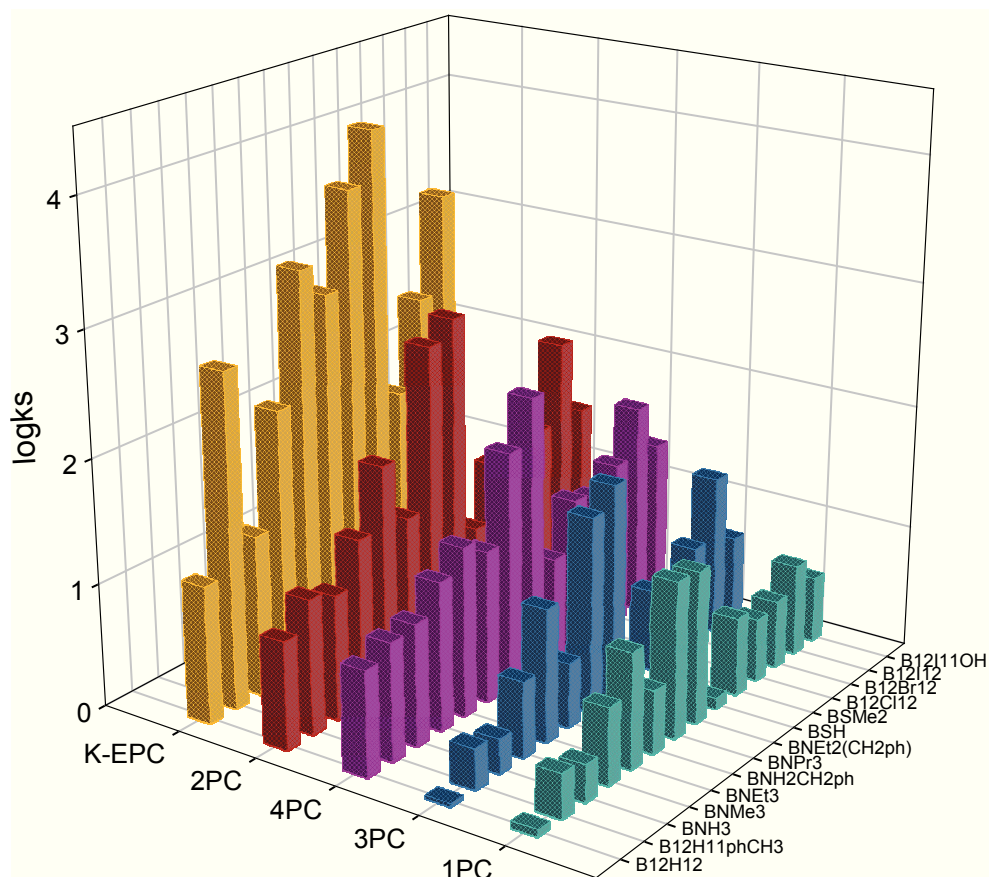


Abb. 8.11 Vergleich der logk-Werte von allen Borclusterverbindungen

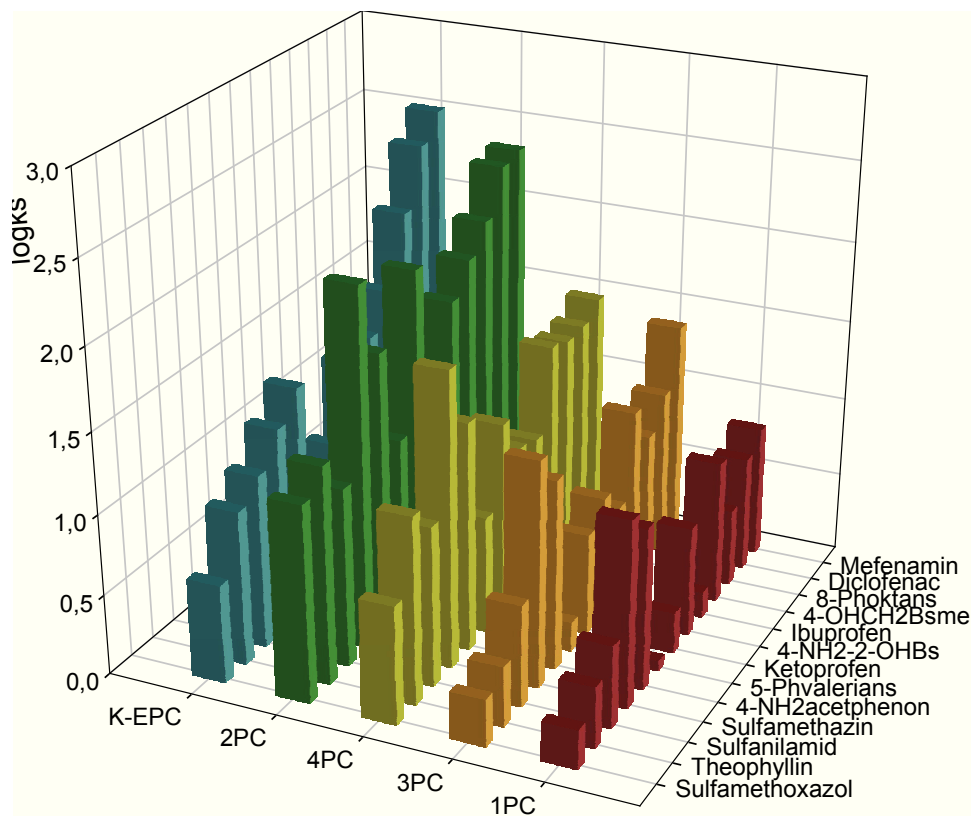


Abb. 8.12a Vergleich der logk-Werte von ausgewählten chemischen Verbindungen und Arzneimitteln

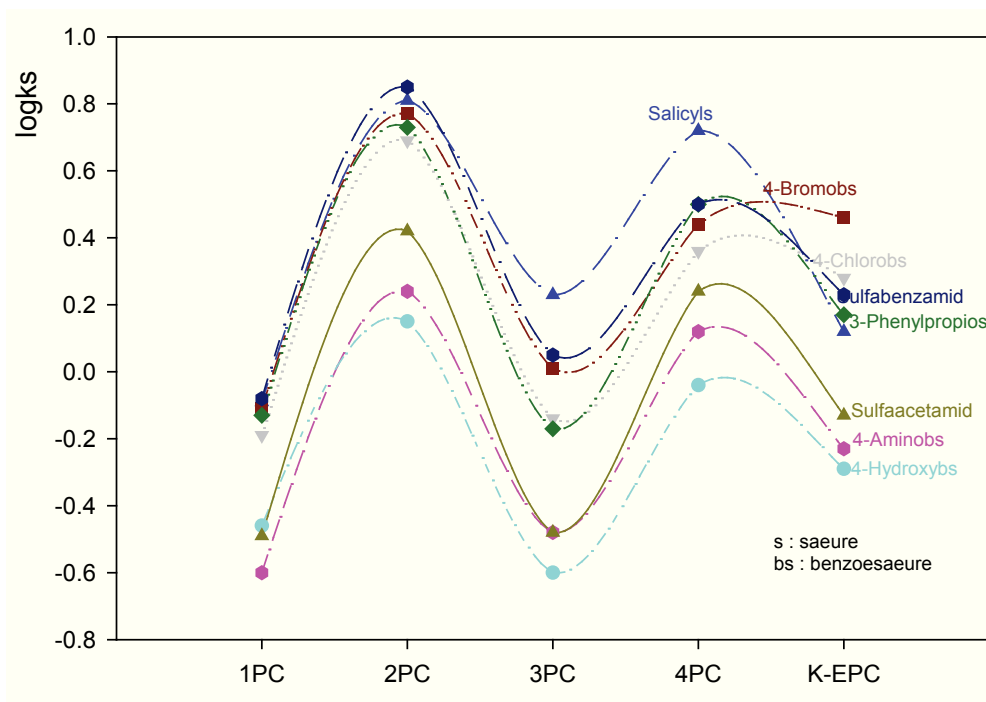


Abb. 8.12b Vergleich der Retention von ausgewählten chemischen Verbindungen und Arzneimitteln mit negativen logks-Werten

- Die Substitution des Wasserstoffs der Aminogruppe ($-\text{NH}_3$) von BNH_3 mit einer Kohlenstoffkette oder Kohlenstoffketten verlängert die Retentionen der neuen Substanzen. Je mehr Kohlenstoffketten an den Stickstoff (maximal 3) gebunden sind und je länger oder größer die Kohlenstoffkette ist, desto mehr werden diese Substanzen verzögert.
- Was die halogenierten Borclusterverbindungen betrifft, ist die Größe des Halogenatoms wichtig für deren Retentionen. Mit zunehmender Atomgröße steigert sich die Retention dementsprechend.

Bei der Wechselwirkung von Borclusterverbindungen mit Liposomen (K-EPC-Gel) spielen sowohl die elektrischen als auch die hydrophoben Wechselwirkungen eine Rolle. Wenn die logks-Werte von Borclusterverbindungen, ausgenommen der halogenierten Verbindungen, betrachtet werden, ist es ersichtlich, dass die zunehmenden hydrophoben Wechselwirkungen aufgrund der Substitution oder den Substitutionen, welche entweder direkt an Dodecahydridecaborat oder an Schwefel bzw. Stickstoff ist oder sind, erhöhte Retention dieser Verbindungen in einer K-EPC-Säule verursacht. Diese Verbindungen konnten gut mit Kopfgruppen der Liposomen wechselwirken und wenn es bei diesen Verbindungen eine Kohlenstoffkette oder Kohlenstoffketten gibt, könnten diese hydrophobe Kette oder die hydrophoben Kohlenstoffketten vermutlich auch in die hydrophobe Doppelschicht des Liposoms eindringen. Eventuell gibt es eine Änderung der

Morphologie von Liposomen. Dadurch würde die Retention mit Länge der Kette erheblich verstärkt werden.

Die logks-Werte von halogenierten Clusterverbindungen an K-EPC wiesen darauf hin, dass die halogenierten Cluster gut mit Kopfgruppen und hydrophobem Teil von Liposomen wechselwirken konnten. Die Elution von diesen halogenierten Clusterverbindungen durch eine K-EPC-Säule ließ die Schlußfolgerung zustande kommen, da in 20 Stunden die bromierte- und iodierte Clusterverbindung nicht detektiert werden konnten. Bei der Elution der chlorierten Clusterverbindung wurde ein merkwürdiges Chromatogramm beobachtet (Abb. 8.13). Die Intensität des Signals war niedrig, abgesehen davon sind ein paar Peaks zu sehen.

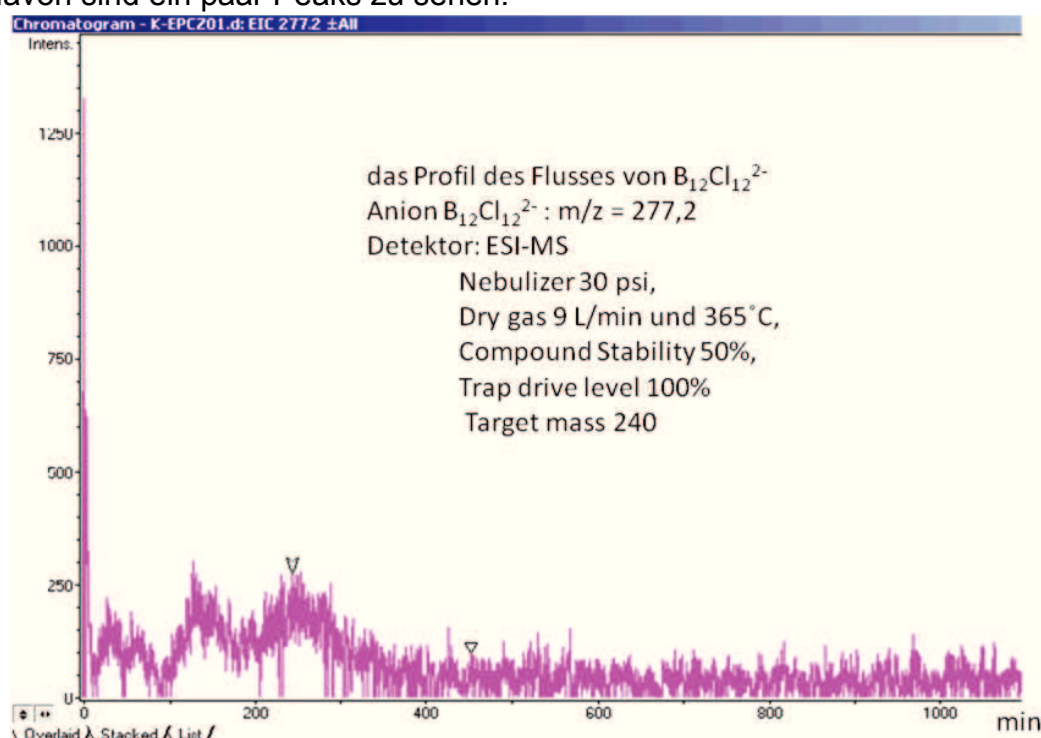


Abb. 8.13 Chromatogramm von $B_{12}Cl_{12}^{2-}$ (Säule: K-EPC)

Die Wechselwirkung von Borclusterverbindungen mit 1PC-, 2PC-, 3PC- und 4PC-Gel stimmte zwar mit den obigen Schlußfolgerungen (siehe Punkt 1-4) überein, aber ist nicht wie erwartet.

Die logks-Werte an 2PC-Gel waren größer als die an 4PC-Gel und die logks-Werte an 1PC-Gel waren am kleinsten. Die größeren logks-Werte an 2PC-Gel könnten darauf hinweisen, dass die elektrischen Wechselwirkungen zwischen diesen Clusterverbindungen und den Kopfgruppen der Liposomen eine wichtige Rolle spielten. Unter Berücksichtigung des Beitrags vom hydrophoben Effekt sollte die Wechselwirkung zwischen Borclusterverbindungen und 3PC-Gel stärker sein als die zwischen diesen

Clusterverbindungen und 2PC-Gel, nämlich $\log k_{s3PC} > \log k_{s2PC}$, aber in der Tat ist es nicht. Es sollte die folgende Beziehung geben wenn beide Wechselwirkungen zur Retention hätten beitragen können, und zwar $\log k_{s3PC} > \log k_{s4PC} > \log k_{s1PC} > \log k_{s2PC}$, in Wirklichkeit gab es nur $\log k_{s3PC} > \log k_{s1PC}$ und $\log k_{s4PC} > \log k_{s1PC}$. Eine mögliche Ursache könnte darin liegen, dass die addierten Gruppen am Silicagel nicht dicht genug aneinander waren, und eine Ähnlichkeit mit Membranen nicht geschaffen wurde. Eine andere mögliche Ursache wäre die zu kleine Stoffmenge vom Phosphatidylcholin beim 2PC-Gel und 4PC-Gel. Beim Berechnen der $\log k_s$ -Werte wird aber das Retentionsvolumen durch A dividiert und eine kleine Änderung von Retention, z.B. aufgrund unspezifischer Wechselwirkung, führt zur drastischen Veränderung von $\log k_s$.

Die chemischen Verbindungen und Arzneimittel, welche unter experimentalen Bedingungen untersucht wurden, sind fast alle negativ bzw. positiv geladen oder zwitterionisch. Davon sind substituierte Benzoesäure, Ibuprofen, Mefenaminsäure und Diclofenac negativ geladen, und Sulfa-Verbindungen, Theophyllin und Aminoacetophenon sind positiv geladen.

In Abb. 8.12a und Abb. 8.12b ist es zu sehen, dass die Wechselwirkung zwischen den Verbindungen und Liposomen (K-EPC) von der Hydrophobie der Verbindungen abhängig war. Je hydrophober eine Verbindung ist, desto stärker wechselwirkte sie mit den Liposomen und desto länger wurde sie in einer K-EPC-Säule verzögert. Beispiele waren die $\log k_s$ -Werte von Salicylsäure, Chlorobenzoessäure, Bromobenzoessäure, 8-Phenyl oktansäure, Diclofenac und Mefenaminsäure. Die letzten drei Substanzen sind hydrophober und hatten daher größere $\log k_s$ -Werte, nämlich 2,02, 2,37 und 2,52 und die $\log k_s$ -Werte von den ersten drei waren kleiner als 0,5. Dasselbe gilt für die positiv geladenen Substanzen.

Die Untersuchung von diesen chemischen Verbindungen und Arzneimitteln mit 1PC-, 2PC-, 3PC- und 4PC-Gel brachte ein ähnliches Ergebnis wie bei der Untersuchung von Borclusterverbindungen. Es ergab sich die folgende Beziehung: $\log k_{s2PC} > \log k_{s4PC} > \log k_{s3PC} > \log k_{s1PC}$. Die größten Retentionen wurden bei 2PC-Gel beobachtet, die Gründe dafür wurden bei der Diskussion der $\log k_s$ -Werte von Borclusterverbindungen gegeben. Abgesehen davon wurden einige negative $\log k_s$ -Werte hauptsächlich bei 1PC-Gel, 3PC-Gel und eventuell auch bei K-EPC-Gel beobachtet (Abb. 8.12b), negative $\log k_s$ -Werte bedeuten, dass die k_s -Werte größer als 0 und kleiner als 1 sind, und die Substanzen schwache Retentionen haben. Es ist aber zu betonen, dass es keinen großen Unterschied bei der Retention einer Substanz mit $k_s = 0,99$ und

einer anderen Substanz mit $k_s = 1.01$ gibt, obwohl ein $\log k_s$ negativ und das andere $\log k_s$ positiv ist. Abb. 8.12b ist die Ergänzung der Abb. 8.12a, weil es schwer ist, in Abb. 8.12a negative $\log k_s$ darzustellen. Die Tendenz der Änderung von $\log k_s$ blieb unverändert, nämlich $\log k_{s2PC} > \log k_{s4PC} > \log k_{s3PC} > \log k_{s1PC}$. Die Substanzen, die negative $\log k_s$ -Werte gezeigt haben, beziehen sich um die hydrophilen Substanzen, wie z.B. Salicylsäure, Aminobenzoessäure, Hydroxybenzoessäure, Chlorobenzoessäure und Bromobenzoessäure usw. Vermutlich hätte der hydrophobe Teil von 1PC-Gel und 3PC-Gel die Retentionen von solchen Substanzen reduziert.

8.9 Zwischenprodukte bei der Gelherstellung

Bei der Herstellung von 1PC-, 2PC-, 3PC- und 4PC-Gel gibt es immer Zwischenprodukte oder Zwischengelmaterien, bevor schlussendlich die gewünschten Säulenmaterialien erhalten werden.

Diese Zwischengelmaterien sind z.B. SiCl-Gel, $\text{Si}-(\text{CH}_2)_3\text{O}(\text{CH}_2)_6\text{Cl}$ usw. und diese wurden weiter mit dem Tetrabutylammoniumsalz des Cholinphosphats modifiziert. Das SiCl-Gel ist das Vorprodukt vom 1PC-Gel und kann als V1PC-Gel benannt werden; $\text{Si}-(\text{CH}_2)_3\text{O}(\text{CH}_2)_6\text{Cl}$ ist das Vorprodukt vom 3PC-Gel und wird als V3PC bezeichnet.

Diese Zwischengelmaterien wurden in Säulen gepackt und die Retention von den Dodecaboratclusterverbindungen bzw. den untersuchten Verbindungen an diesen Zwischengelmaterien wurde damit gemessen.

Der Vergleich von den Retentionszeiten aus dem SiCl-Gel bzw. dem 1PC-Gel und aus dem V3PC-Gel bzw. dem 3PC-Gel ist in Tab. 8.18 zu sehen. Die Grafikdarstellung des Vergleiches von Retentionszeiten ist in Abb. 8.14 - Abb. 8.17 abgebildet.

Es ist deutlich zu sehen, dass die Tendenz der Änderung der Retentionszeiten sowohl beim 1PC-Gel bzw. SiCl-Gel als auch beim V3PC-Gel bzw. 3PC-Gel sehr ähnlich war. Die Retentionszeiten von lipophileren Verbindungen bzw. Borclusterverbindungen waren beim SiCl-Gel und beim V3PC-Gel größer als beim 1PC-Gel und beim 3PC-Gel. Die Retentionszeiten von hydrophilen Substanzen bzw. Borclusterverbindungen zeigten keinen großen Unterschied beim SiCl-Gel bzw. 1PC-Gel und beim V3PC-Gel bzw. 3PC-Gel. Der Grund dafür könnte darin liegen, dass bei dem SiCl-Gel und dem V3PC-Gel ein Chlor aber nicht die zwitterionische Kopfgruppe des Phosphatidylcholins vorhanden ist, von daher würde die elektrostatische Wechselwirkung eine kleine oder gar

keine Rolle spielen. Die hydrophobe Wechselwirkung wäre entscheidend für die Retention, hydrophobere Substanzen würden stärker durch die hydrophoben Säulenmaterialien verzögert werden.

Tab. 8.18 Vergleich der Retentionszeiten von den untersuchten Verbindungen bzw. den Borclusterverbindungen ($t_{R, SiCl}$ vs $t_{R, 1PC}$ und $t_{R, V3PC}$ vs $t_{R, 3PC}$)

Probe	SiCl-Gel t_R	1PC-Gel t_R	3PC-Gel t_R	V3PC-Gel t_R
K ₂ Cr ₂ O ₇	2,11	2,14	2,02	1,96
Salicylsäure	2,46	2,47	2,55	2,40
4-Aminobenzoesäure	2,28	2,24	2,18	2,11
4-Hydroxybenzoesäure	2,24	2,28	2,14	2,14
4-Chlorobenzoesäure	2,42	2,40	2,34	2,38
4-Amino-2-hydroxybenzoesäure	3,66	4,12	4,18	3,74
4-Bromobenzoesäure	2,48	2,46	2,43	2,49
Theophyllin	5,55	3,13	2,89	9,41
Ketoprofen	3,95	2,88	3,31	13,62
Ibuprofen	3,22	2,74	3,51	7,95
Diclofenac	9,60	4,29	5,67	36,35
3-Phenylpropionsäure	2,44	2,44	2,32	2,42
Sulfacetamid	2,34	2,27	2,22	2,24
Sulfabenzamid	2,45	2,48	2,44	2,60
Sulfanilamid	3,59	3,47	3,58	3,79
Sulfamethoxazol	2,54	2,85	2,65	4,26
Sulfamethazin	10,69	8,11	11,78	32,22
4-Hydroxymethylbenzoesäuremethylester	7,04	5,35	7,33	15,63
4-Aminoacetphenon	7,15	6,27	8,08	12,03
5-Phenylvaleriansäure	2,60	2,61	2,63	3,94
8-Phenyloktansäure	6,49	3,38	-	-
Mefenaminsäure	11,36	4,87	12,78	55,26
K ₂ Cr ₂ O ₇	2,10	2,09	2,20	2,18
Na ₂ B ₁₂ H ₁₂	3,25	2,55	2,60	3,05
Na ₂ B ₁₂ H ₁₁ phCH ₃	3,20	3,02	3,10	3,55
NaBNH ₃	3,05	2,88	3,00	3,25
KBNMe ₃	3,55	3,75	4,00	6,20
KBNEt ₃	5,20	5,53	7,60	14,70
NaBNH ₂ CH ₂ ph	3,45	3,38	3,65	6,35
NaBNPr ₃	16,25	9,40	19,80	51,30
NaBNEt ₂ (CH ₂ ph)	33,85	8,87	27,60	-
Na ₂ BSH	2,98	2,58	2,75	3,60
NaBSMe ₂	3,60	3,82	4,25	5,80
Na ₂ B ₁₂ Cl ₁₂	3,40	3,40	4,10	17,90
Na ₂ B ₁₂ Br ₁₂	4,25	3,50	5,30	28,10
Na ₂ B ₁₂ I ₁₂	-	4,30	11,60	-
Na ₂ B ₁₂ I ₁₁ OH	5,75	3,43	4,30	-

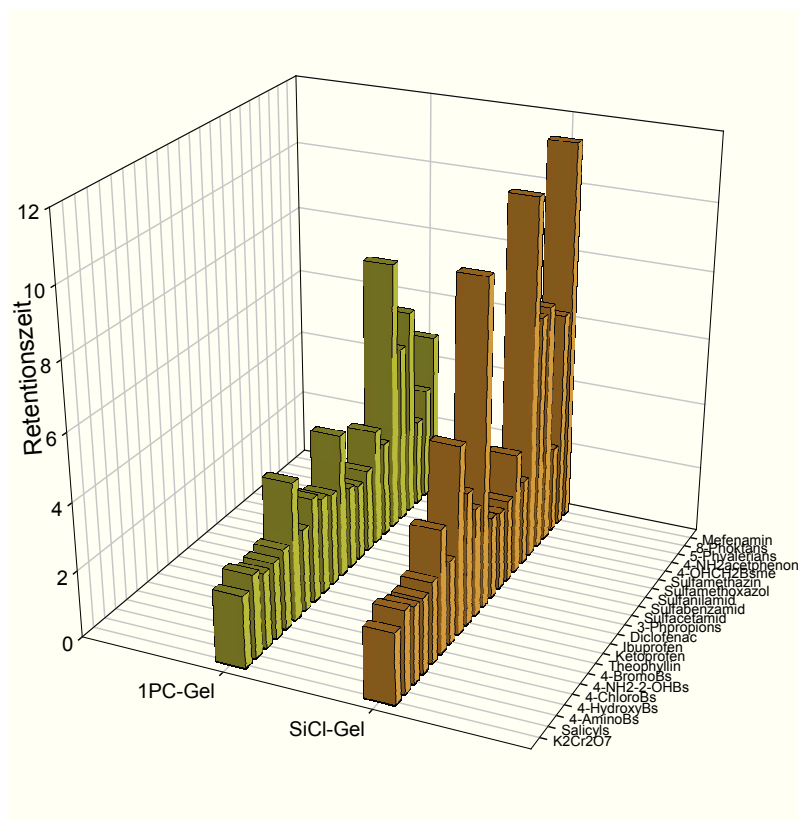


Abb. 8.14 Vergleich der Retentionszeiten der untersuchten Substanzen an 1PC-Gel und SiCl-Gel

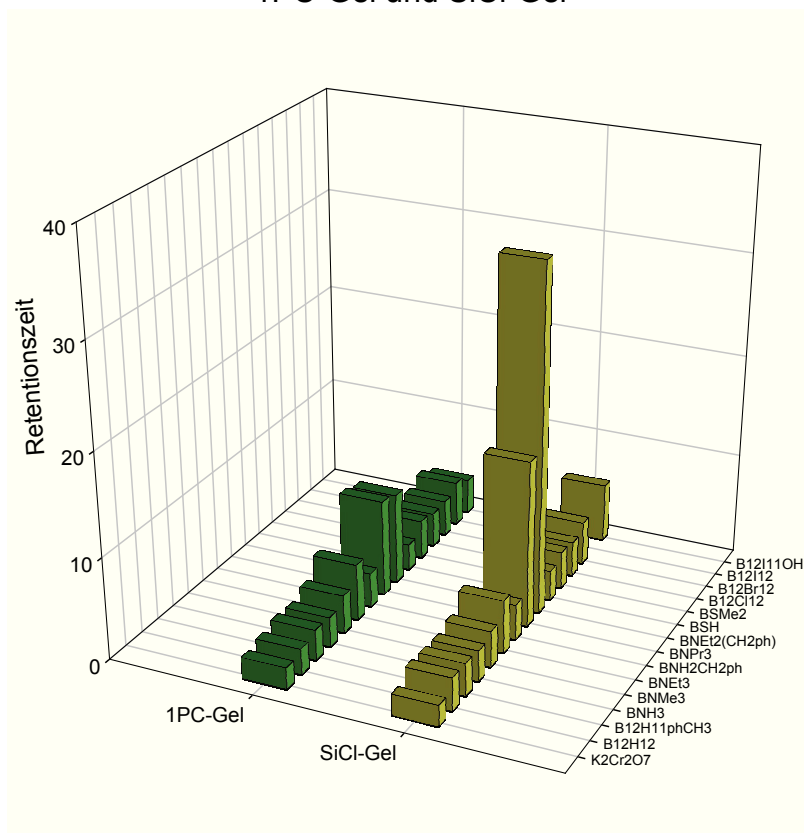


Abb. 8.15 Vergleich der Retentionszeiten der Borclusterverbindungen an 1PC-Gel und SiCl-Gel

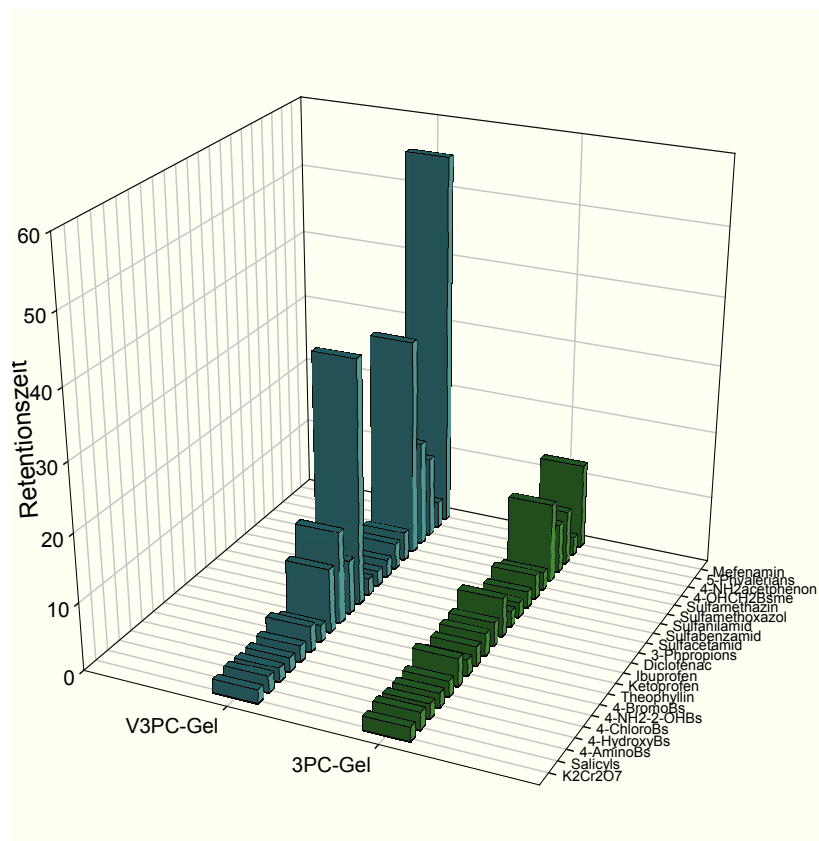


Abb. 8.16 Vergleich der Retentionszeiten der untersuchten Substanzen an V3PC-Gel und 3PC-Gel

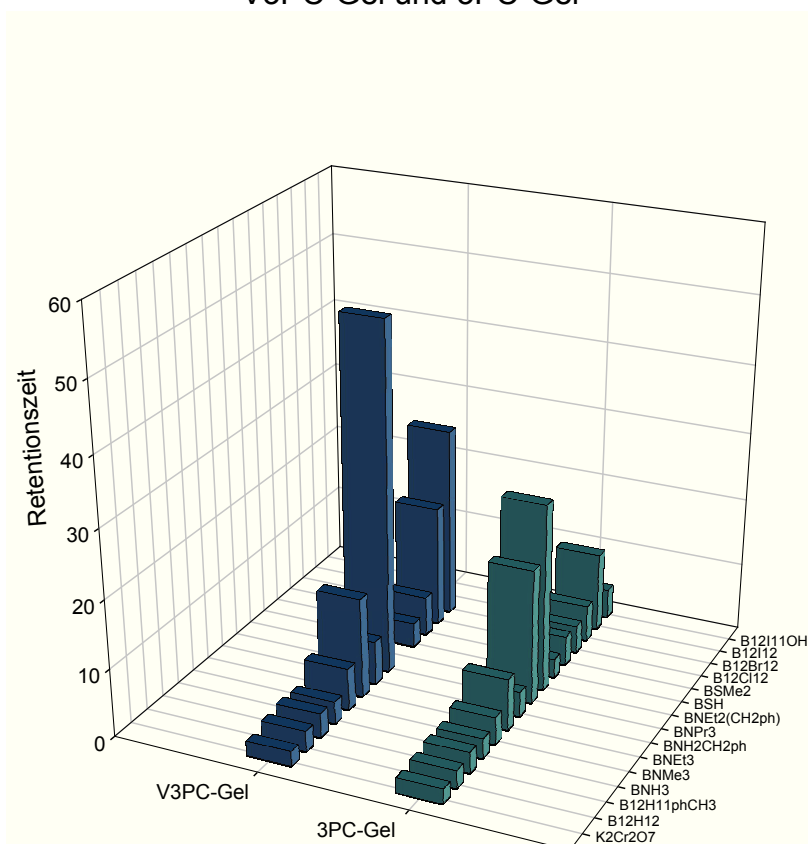


Abb. 8.17 Vergleich der Retentionszeiten der Borclusterverbindungen an V3PC-Gel und 3PC-Gel

8.10 Stabilität der Säulenmaterialien

Die Stabilität der Säulenmaterialien ist ein wichtiger Aspekt für die chromatographische Untersuchung. Je stabiler ein Säulenmaterial ist, desto länger kann die Säule eingesetzt werden und desto besser ist die Reproduzierbarkeit der Messungen. Falls das Säulenmaterial durch den hohen Gegendruck der Säule oder durch Hydrolyse usw. beschädigt werden kann, reduziert sich die Stabilität des Säulenmaterials.

Die in diesem Kapitel beschriebenen Säulenmaterialien erlitten bedauerlicherweise Hydrolyse. In Tab. 8.19 - Tab. 8.21 sind die Retentionszeiten, die in unterschiedlichem Zeitabstand mit dem 1PC-, 2PC- und 3PC-Gel gemessen wurden, gelistet. Es ist deutlich zu sehen, dass es eine 5%-15%ige Reduzierung der Retentionszeiten, nach 7 Tagen, mit dem 1PC-Gel gab. Die Messungen, welche mit dem 2PC-Gel nach 17 Tagen durchgeführt wurden, zeigten eine noch stärkere Reduzierung der Retentionszeiten von einigen Substanzen, hier betrug die maximale Abnahme ca.31%. Die Reduzierungen der Retentionszeiten könnten aber auch sehr abhängig vom Säulenmaterialien sein. Das ist in den Ergebnissen, welche mit dem 3PC-Gel zu erhalten waren, zu sehen. Während den zehntägigen Messungen hatten die Retentionszeiten bis maximal 46% abgenommen.

Die starke Reduzierung der Retentionszeiten wurde auch bei K-EPC-Gel beobachtet.

Tab. 8.19 Abnahme der Retentionszeit nach 7 Tagen mit dem 1PC-Gel

Probe	Retentionszeit min	Retentionszeit min Nach 7 Tagen	Abnahme der Retentionszeit%
4-Amino-2-Hydroxybenzoesäure	4,12	3,88	5,83
Diclofenac	4,56	4,34	4,82
Sulfamethazin	8,42	7,24	14,01
4-Hydroxymethylbenzoesäuremethylester	5,40	4,68	13,33
Aminoacetophenon	6,30	5,37	14,76
Mefenaminsäure	5,19	4,88	5,97

Tab. 8.20 Abnahme der Retentionszeit nach 17 Tagen mit dem 2PC-Gel

Probe	Retentionszeit min	Retentionszeit min Nach 17 Tagen	Abnahme der Retentionszeit%
Ibuprofen	8,12	6,14	24,38
Ketoprofen	15,99	11,14	30,33
Theophyllin	4,56	4,07	10,75
Sulfamethazin	21,59	15,07	30,20
4-OHCH ₂ benzoesäure	10,94	8,17	25,32
4-NH ₂ -acetophenon	8,42	6,51	22,68
8-Phenylaktansäure	15,38	10,62	30,95
Mefenaminsäure	26,79	20,43	23,74

Tab. 8.21 Abnahme der Retentionszeit in 10 Tagen mit dem 3PC-Gel

Probe	Retentionszeit min	Retentionszeit min Am 10. Tag	Abnahme der Retentionszeit %
4-Amino-2-hydroxybenzoesäure	4,18	3,68	11,96
Diclofenac	5,67	5,44	4,06
Sulfamethazin	11,78	8,60	26,99
4-Hydroxymethylbenzoe säuremethylester	7,33	5,02	31,51
4-Aminoacetphenon	8,08	5,66	29,95
Mefenaminsäure	12,78	6,90	46,01

Durch die obigen Ergebnisse kann gesagt werden, dass die Stabilität der Säulenmaterialien nicht gut genug ist. Es könnte weiter versucht werden, bessere und stabilere Modifizierungen zu schaffen und die optimalen Elutionsbedingungen zu finden.

9. Biomimetische Chromatographie

Es handelt sich bei der biomimetischen Chromatographie um eine neue stationäre Phase, welche auf einer RP-18-Säule basiert. Liposomen werden eventuell durch hydrophobe Wechselwirkung in der RP-18-Säule immobilisiert.

9.1 Bereitstellung einer biomimetischen chromatographischen Säule

Ein Lipidfilm aus gewünschtem Phospholipid oder aus einem Gemisch von unterschiedlichen Phospholipiden bzw. anderen Lipiden wurde vorbereitet. Zur Hydratisierung wurde eine Lösung, welche 10 mM NaHCO_3 und 5% (Volumenprozent) Methanol enthält, verwendet. Nach Extrudieren durch einen 100 nm Polycarbonatfilm wurde schlussendlich eine ungefähr 100 mM unilamellare Liposomensuspension hergestellt. Die unilamellare Liposomensuspension wurde dann in 2 Liter 10 milimolariger NaHCO_3 -Lösung, die 5% (Volumenprozent) Methanol enthält, gegeben.

Bei einer konstanten Flussrate von 1 mL/min wurde die vorher hergestellte liposomenhaltige Lösung durch eine RP-18-Säule für ca. 30 Stunden gepumpt. Die Liposomen wurden in der Säule immobilisiert.

9.2 Menge der immobilisierten Phospholipiden

Auch für diese Art von Chromatographie kann der spezifische Retentionsfaktor k_s angewendet werden. Für die Berechnung von k_s wird die Menge an immobilisierten Phospholipiden gebraucht, daher muss das Phospholipid nach allen Messungen wieder aus der Säule gewaschen werden. Dafür wurde 70 mL Chloroform verwendet und nach Phosphat-Assay kann die Menge an Phospholipid bestimmt werden.

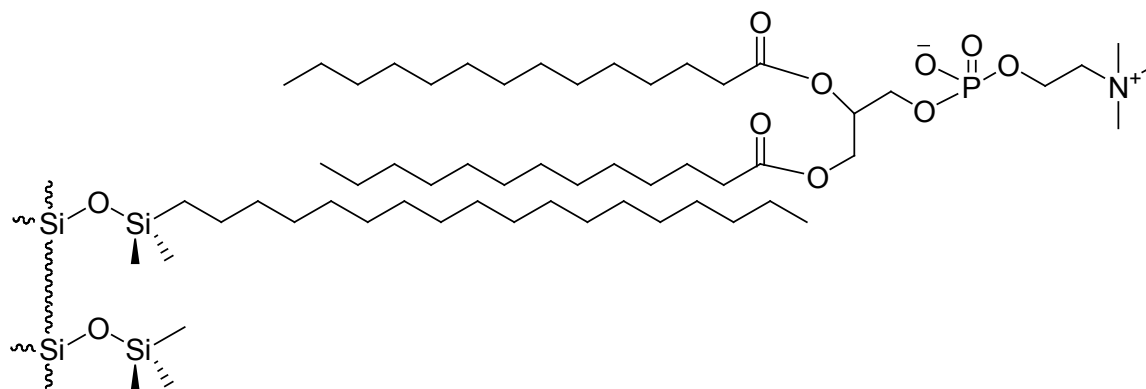


Abb. 9.1 Hypothetische Immobilisierung durch hydrophobe Wechselwirkung zwischen einem Liposom und C18-Ketten der RP-18-Säule

Tab. 9.1 Messergebnisse von Borclusterverbindungen mit einer biomimetischen DPPC-Säule bei drei Temperaturen

Probe	Retentionszeit t_{R1} min	Retentionszeit t_{R2} min	Mittelwert t_R min	Flußrate mL/min	Retentions volumen mL	$V_R - V_0$	$ks = (V_R - V_0)/A$	Inks	ΔG° 283K
K ₂ Cr ₂ O ₇	1,30	1,35	1,33	1,00	1,33				
Na ₂ B ₁₂ H ₁₂	14,30	17,50	15,90	1,00	15,90	14,58	26,03	3,26	-7,67
Na ₂ BSH	21,70	25,90	23,80	1,00	23,80	22,48	40,13	3,69	-8,69
NaBNH ₃	16,50	16,20	16,35	1,00	16,35	15,03	26,83	3,29	-7,74
KBNMe ₃	156,60	-	156,60	1,00	156,60	155,28	277,28	5,63	-13,23
Probe	Retentionszeit min	Retentionszeit min	Mittelwert min	Flußrate mL/min	Retentions volumen mL	$V_R - V_0$	$ks = (V_R - V_0)/A$	Inks	ΔG° 298K
K ₂ Cr ₂ O ₇	0,95	0,95	0,95	1,00	0,95				
Na ₂ B ₁₂ H ₁₂	7,40	7,50	7,45	1,00	7,45	6,13	10,94	2,39	-5,93
Na ₂ BSH	13,10	13,50	13,30	1,00	13,30	11,98	21,38	3,06	-7,59
NaBNH ₃	7,80	8,00	7,90	1,00	7,90	6,58	11,74	2,46	-6,10
KBNMe ₃	70,00	67,50	68,75	1,00	68,75	67,43	120,40	4,79	-11,87
Probe	Retentionszeit min	Retentionszeit min	Mittelwert min	Flußrate mL/min	Retentions volumen mL	$V_R - V_0$	$ks = (V_R - V_0)/A$	Inks	ΔG° 310K
K ₂ Cr ₂ O ₇	0,75	0,78	0,77	1,00	0,77				
Na ₂ B ₁₂ H ₁₂	3,00	3,90	3,45	1,00	3,45	2,13	3,79	1,33	-3,44
Na ₂ BSH	4,80	5,70	5,25	1,00	5,25	3,93	7,01	1,95	-5,02
NaBNH ₃	4,70	-	4,70	1,00	4,70	3,38	6,03	1,80	-4,63
KBNMe ₃	38,40	45,90	42,15	1,00	42,15	40,83	72,90	4,29	-11,05

A: Stoffmenge der Phospholipide

9.3 Messergebnisse und Diskussion

Die Messungen von $\text{Na}_2\text{B}_{12}\text{H}_{12}$, Na_2BSH , NaBNH_3 und KBNMe_3 wurden mit einer biomimetischen DPPC-Säule durchgeführt und zwar bei drei Temperaturen ($10^\circ\text{C}(283\text{K})$, $25^\circ\text{C}(298\text{K})$ und $37^\circ\text{C}(310\text{K})$). Die Ergebnisse sind in Tab. 9.1 gelistet.

Abb. 9.2 zeigt das Auftragen von $\ln k_s$ gegen $1/T$. Dadurch können ΔH° und ΔS° , welche aufgrund der Wechselwirkung mit der biomimetischen Säule zustande gekommen sind, berechnet werden (Tab. 9.2).

Hier wurden die folgenden physikalisch chemischen Gleichungen (9-1 und 9-2) verwendet,

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T \Delta S^\circ = -RT \ln k_s \quad (9-1)$$

$$\ln k_s = -\Delta H^\circ/RT + \Delta S^\circ/R \quad (9-2)$$

Die stationäre Phase dieser Art von Chromatographie ist, streng genommen, die Liposomen, die in der Säule immobilisiert sind. Zur Bestimmung der Phasenverhältnisse soll das Volumen der Liposomen bekannt sein, aber dieses Volumen ist schwer festzustellen. Allerdings, die Stoffmenge der liposomenbildenden Phospholipide ist in k_s ausgedrückt, von daher wird k_s als $k \cdot \Phi$ betrachtet, und ΔG° wird mit Hilfe von der Gleichung (9-1) berechnet.

Für $\text{B}_{12}\text{H}_{12}^{2-}$ gab es folgende Gleichung:

$$\ln k_s = 6174,2/T - 18,489, R^2 = 0,9785$$

$$-\Delta H^\circ/R = 6174,2 \text{ und } \Delta S^\circ/R = -18,489$$

Für BNH_3^- gab es folgende Gleichung:

$$\ln k_s = 4839,9/T - 13,802, R^2 = 0,9992$$

$$-\Delta H^\circ/R = 4839,9 \text{ und } \Delta S^\circ/R = -13,802$$

Für BSH^{2-} gab es folgende Gleichung:

$$\ln k_s = 5543,2/T - 15,789, R^2 = 0,9392$$

$$-\Delta H^\circ/R = 5543,2 \text{ und } \Delta S^\circ/R = -15,789$$

Für BNMe_3^- gab es folgende Gleichung:

$$\ln k_s = 4361,5/T - 9,804, R^2 = 0,9972$$

$$-\Delta H^\circ/R = 4361,5 \text{ und } \Delta S^\circ/R = -9,804$$

Die Änderung der Enthalpie ΔH° war negativ, das bedeutet, dass durch die

Wechselwirkung Wärme freigesetzt wurde. Was merkwürdig war, die Änderung der Entropie ΔS° war auch negativ; das heißt, dass die Ordnung des Systems reduziert wurde. Warum die Entropie abgenommen hat, ist unklar. Allerdings war die Änderung der Entropie ΔS° klein. Die Gibbs freie Energie war kleiner als 0 und die Wechselwirkungen waren freiwillig (Abb. 9.3).

Bei der Untersuchung der Wechselwirkung von Borclusterverbindungen mit hydrophilen Säulenmaterialien wurden auch negative ΔH° und ΔS° erhalten. Die absoluten ΔH° -, ΔS° - und ΔG° -Werte von BNH_3^- und BNMe_3^- an Superdex 200 sowie von $\text{B}_{12}\text{H}_{12}^{2-}$ an Sephadex G-100 sind aber kleiner als die absoluten ΔH° -, ΔS° - und ΔG° -Werte von den gleichen Substanzen an biomimetischem Säulenmaterial. Das heißt, dass diese Clusterverbindungen mit biomimetischem Säulenmaterial, nämlich Lipiden und C18-Ketten, stärker wechselwirken können.

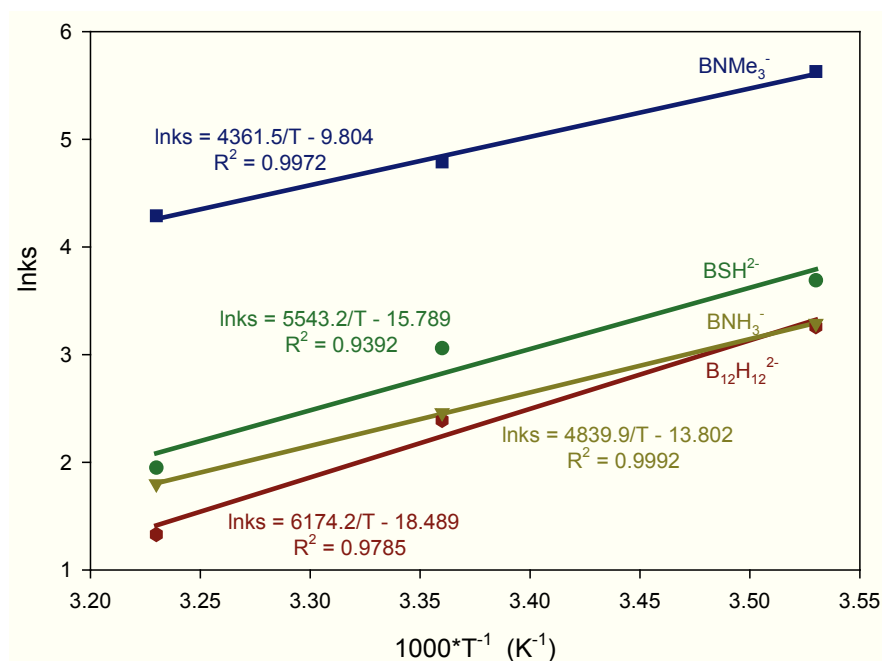


Abb. 9.2 Auftrag von $\ln k_s$ gegen $1/T$

Tab. 9.2 ΔH° und ΔS° aufgrund der Wechselwirkung mit biomimetischer Säule

	$\text{Na}_2\text{B}_{12}\text{H}_{12}$	Na_2BSH	NaBNH_3	KBNMe_3
ΔH° $\text{kJ}\cdot\text{Mol}^{-1}$	-51,50	-46,24	-40,37	-36,38
ΔS° $\text{J}\cdot\text{Mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$	-153,72	-131,27	-114,75	-81,51
$T\cdot\Delta S^\circ$ $\text{kJ}\cdot\text{Mol}^{-1}$ (T=298K)	-45,89	-39,04	-34,27	-24,44

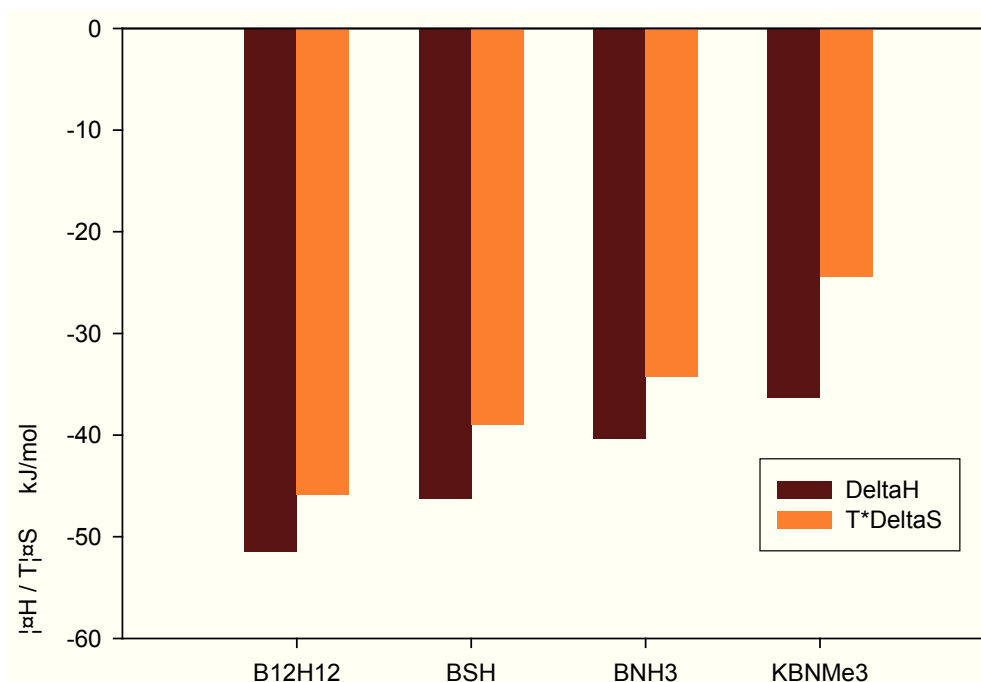


Abb. 9.3 Kompensieren von ΔH° durch $T\Delta S^\circ$ ($T = 298 \text{ K}$). $\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$, die Gibbs frei Energie war kleiner als 0.

Es ist in Tab. 9.1 ersichtlich, dass die Zunahme der Hydrophobie die Retention dramatisch erhöhen kann. Beispiele waren die Retentionen von BNH_3^- und BNMe_3^- , die Retentionszeit von BNH_3^- war knapp 8 Minuten bei RT und die Retentionszeit von BNMe_3^- war ca. 70 Minuten bei RT. Die Retention von BNEt_3^- wurde auch gemessen, aber in ca. 5 Stunden wurde nichts detektiert. Von daher wurde es auf die weiteren Messungen von BNPr_3^- , BNBnEt_2^- usw. verzichtet.

Es ist also zu behaupten, dass die hydrophoben Wechselwirkungen eine wichtige Rolle bei den Retentionen spielten. Jedoch kann die Retention nicht nur auf die Wechselwirkungen zwischen Substanzen und Liposomen zurückgeführt werden, weil es in der Säule bestimmt noch viele freie C18-Ketten gibt. Die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Kohlenstoffketten der Substanzen und C18-Ketten können die Retentionen der Substanzen erheblich verstärken. Das könnte auch der Nachteil dieser Art von Chromatographie sein, es gibt immer einen großen Teil von unspezifischen Wechselwirkungen und dadurch können die genauen Wechselwirkungen zwischen den Substanzen und den Liposomen nicht spezifiziert werden. Die Verwendung der biomimetischen Chromatographie ist deswegen sehr beschränkt.

10. Silicagel mit einer EPC-Beschichtung

Noch eine mögliche chromatographische stationäre Phase ist Silicagel mit einer EPC-Beschichtung (Mao et al. 2002). Die Herstellung von dieser Art Gelmaterial ist in Abb. 10.1 dargestellt.

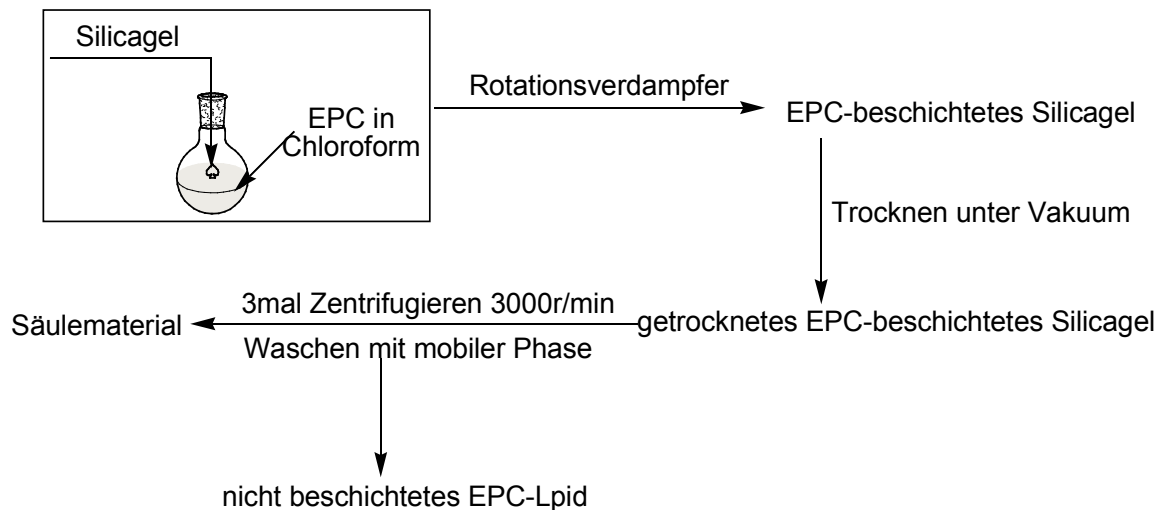


Abb. 10.1 Beschichtung von EPC auf Silicagel

Es gibt keine kovalenten Bindungen zwischen dem EPC-Lipid und der Silicageloberfläche. Aufgrund der Unlöslichkeit des Lipids in Wasser kann die EPC-Beschichtung eine gewisse Zeit am Silicagel bei Elution mit wässrigen Lösungen bestehen bleiben. Aber im Laufe der Zeit kann die Beschichtung langsam beschädigt werden, das heißt, dass die Stabilität der stationären Phase nicht gut genug ist.

In Tab. 10.1 und Tab. 10.2 sind die Messungsergebnisse von chemischen Verbindungen und Arzneimitteln gelistet. Die Messungen wurden mit zwei Säulen durchgeführt. Das chromatographische System besteht aus einem Merck® L-6200A-Pumpe-System und einem UV-Vis-Detektor L-4250 (Merck-Hitachi Ltd., Tokyo, Japan). Die mobile Phase ist 10 mM Ammoniumformiat-Lösung, pH7,4.

Die Retentionszeiten und die log_k-Werte zeigten eine ähnliche Tendenz (Abb. 10.1) wie bei den Messungen mit dem K-EPC-Gel. Abb. 10.2 zeigt das Vergleich von k aus Silicagel mit k_s aus EPC-Beschichtungsgel. Diese Art von stationärer Phase kann in kurzer Zeit zur Messung eingesetzt werden und eine grobe Information der Retention von Substanzen anbieten.

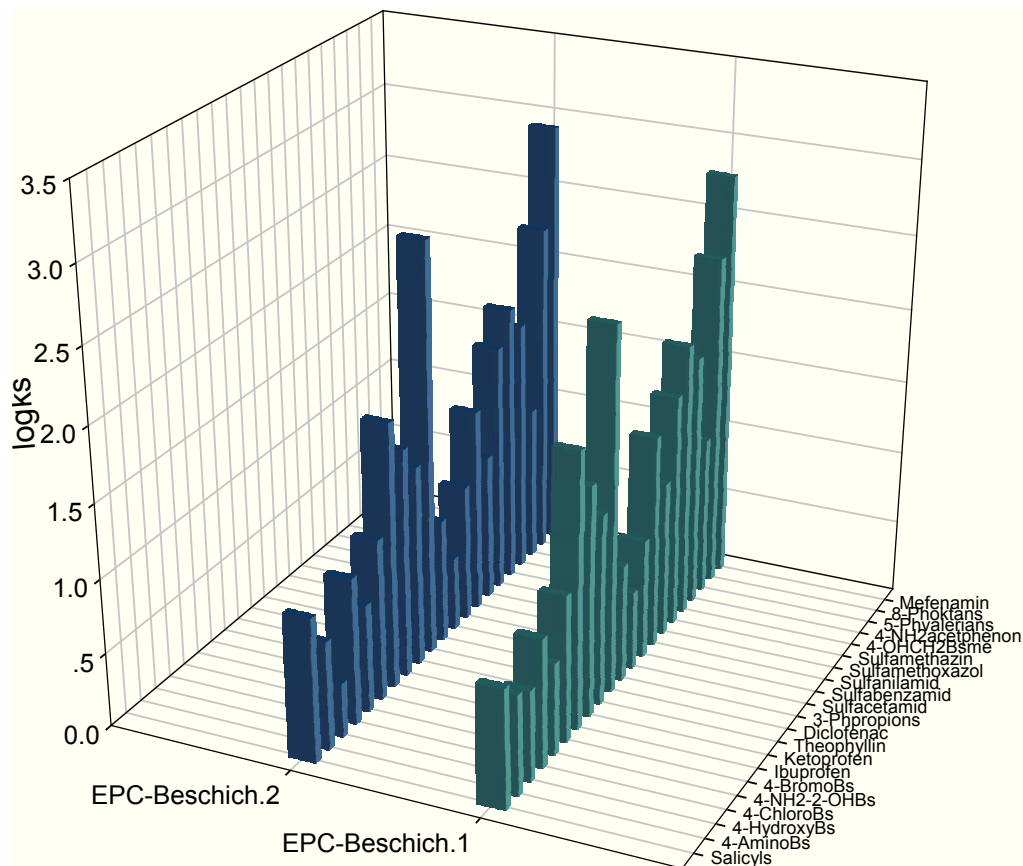


Abb. 10.1 $\log k_s$ -Werte der chemischen Verbindungen und Arzneimitteln. Säulenmaterial: Silicagel mit der EPC-Beschichtung

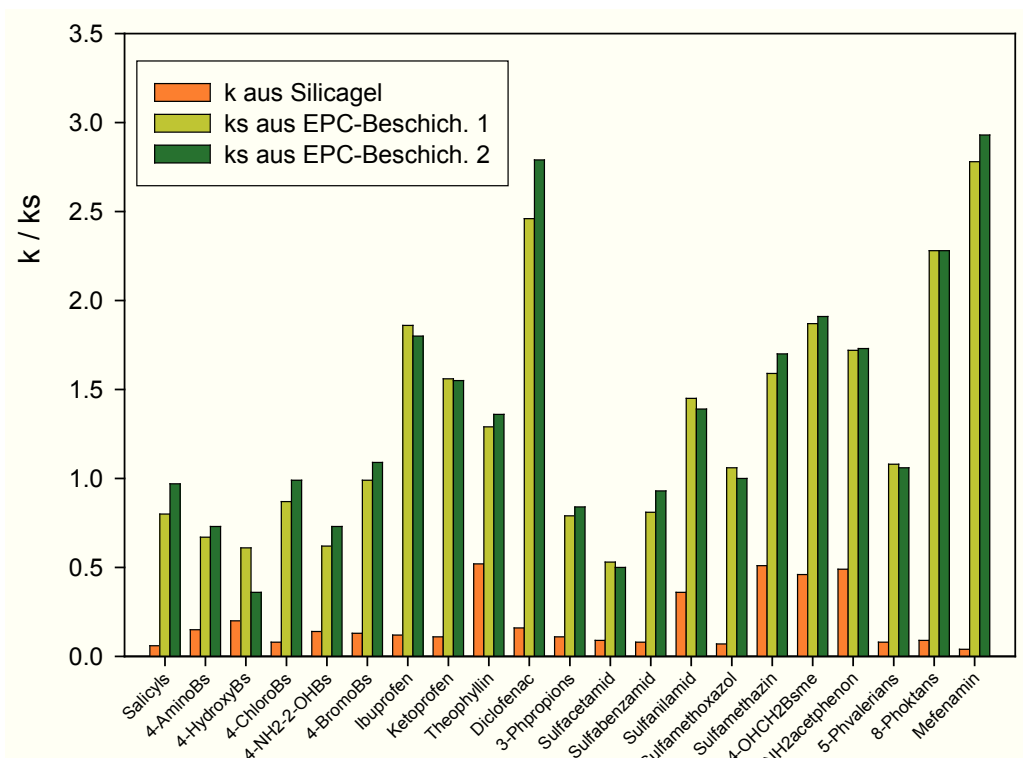


Abb. 10.2 Vergleich von k -Werten aus Silicagel mit k_s -Werten aus dem EPC-Beschichtungsgel 1 und 2

Tab. 10.1 Messergebnisse von chemischen Verbindungen und Arzneimitteln mit EPC-beschichtetem Silicagel1

Probe	Retentions zeit t_{R1} min	Retentions zeit t_{R2} min	Mittelwert t_R min	Flußrate mL/min	Retention svolumen mL	$t_R - t_0$	$V_R - V_0$	$ks = (V_R - V_0)/A^*$	logks
$K_2Cr_2O_7$	1,32	1,34	1,33	0,50	0,67				
Salicylsäure	1,59	1,54	1,57	0,50	0,78	0,24	0,12	6,34	0,80
4-Aminobenzoessäure	1,55	1,46	1,51	0,50	0,75	0,18	0,09	4,72	0,67
4-Hydroxybenzoessäure	1,45	1,51	1,48	0,50	0,74	0,15	0,08	4,05	0,61
4-Chlorbenzoessäure	1,67	1,54	1,61	0,50	0,80	0,28	0,14	7,42	0,87
4-Amino-2-hydroxybenzoessäure	1,48	1,49	1,49	0,50	0,74	0,16	0,08	4,18	0,62
4-Brombenzoessäure	1,78	1,61	1,70	0,50	0,85	0,37	0,18	9,84	0,99
Ibuprofen	5,48	2,57	4,03	0,50	2,01	2,70	1,35	72,68	1,86
Ketoprofen	3,38	1,95	2,67	0,50	1,33	1,34	0,67	36,00	1,56
Theophyllin	2,18	1,92	2,05	0,50	1,03	0,72	0,36	19,42	1,29
Diclofenac	12,10	11,96	12,03	0,50	6,02	10,70	5,35	288,57	2,46
3-Phenylpropionsäure	1,53	1,59	1,56	0,50	0,78	0,23	0,12	6,20	0,79
Sulfacetamid	1,44	1,47	1,46	0,50	0,73	0,13	0,06	3,37	0,53
Sulfabenzamid	1,60	1,54	1,57	0,50	0,79	0,24	0,12	6,47	0,81
Sulfanilamid	2,42	2,34	2,38	0,50	1,19	1,05	0,53	28,32	1,45
Sulfamethoxazol	1,81	1,71	1,76	0,50	0,88	0,43	0,22	11,60	1,06
Sulfamethazin	3,13	2,39	2,76	0,50	1,38	1,43	0,72	38,57	1,59
4-Hydroxymethylbenzoesäuremethylester	4,26	3,87	4,07	0,50	2,03	2,74	1,37	73,76	1,87
4-Aminoacetphenon	3,19	3,40	3,30	0,50	1,65	1,97	0,98	52,99	1,72
5-Phenylvaleriansäure	1,85	1,71	1,78	0,50	0,89	0,45	0,23	12,14	1,08
8-Phenyl oktansäure	6,20	10,59	8,40	0,50	4,20	7,07	3,53	190,53	2,28
Mefenaminsäure	30,43	16,90	23,67	0,50	11,83	22,34	11,17	602,35	2,78

A: Stoffmenge der Phospholipide (oder der Cholinkopfgruppen), 0.0185mmol.

Tab. 10.2 Messergebnisse von chemischen Verbindungen und Arzneimitteln mit EPC-beschichtetem Silicagel2

Probe	Retentions zeit t_{R1} min	Retentions zeit t_{R2} min	Mittelwert t_R min	Flußrate mL/min	Retentions volumen mL	$t_R - t_0$	$V_R - V_0$	$ks = (V_R \cdot V_0) / A^*$	logks
$K_2Cr_2O_7$	1,32	1,32	1,32	0,50	0,66				
Salicylsäure	1,74	1,55	1,65	0,50	0,82	0,33	0,16	9,34	0,97
4-Aminobenzoesäure	1,60	1,41	1,51	0,50	0,75	0,19	0,09	5,32	0,73
4-Hydroxybenzoesäure	1,40	1,40	1,40	0,50	0,70	0,08	0,04	2,30	0,36
4-Chlorbenzoesäure	1,60	1,72	1,66	0,50	0,83	0,34	0,17	9,77	0,99
4-Amino-2-hydroxybenzoesäure	1,59	1,42	1,51	0,50	0,75	0,19	0,09	5,32	0,73
4-Brombenzoesäure	1,67	1,82	1,75	0,50	0,87	0,43	0,21	12,21	1,09
Ibuprofen	3,75	3,33	3,54	0,50	1,77	2,22	1,11	63,79	1,80
Ketoprofen	2,50	2,62	2,56	0,50	1,28	1,24	0,62	35,63	1,55
Theophyllin	2,14	2,10	2,12	0,50	1,06	0,80	0,40	22,99	1,36
Diclofenac	22,68	23,31	23,00	0,50	11,50	21,68	10,84	622,84	2,79
3-Phenylpropionsäure	1,64	1,48	1,56	0,50	0,78	0,24	0,12	6,90	0,84
Sulfacetamid	1,39	1,47	1,43	0,50	0,72	0,11	0,05	3,16	0,50
Sulfabenzamid	1,67	1,56	1,62	0,50	0,81	0,30	0,15	8,48	0,93
Sulfanilamid	2,18	2,18	2,18	0,50	1,09	0,86	0,43	24,71	1,39
Sulfamethoxazol	1,67	1,66	1,67	0,50	0,83	0,35	0,17	9,91	1,00
Sulfamethazin	3,00	3,16	3,08	0,50	1,54	1,76	0,88	50,57	1,70
4-Hydroxymethylbenzoe säuremethylester	4,28	3,96	4,12	0,50	2,06	2,80	1,40	80,46	1,91
4-Aminoacetphenon	3,16	3,21	3,19	0,50	1,59	1,87	0,93	53,59	1,73
5-Phenylvaleriansäure	1,74	1,70	1,72	0,50	0,86	0,40	0,20	11,49	1,06
8-Phenylaktansäure	7,06	8,80	7,93	0,50	3,97	6,61	3,31	189,94	2,28
Mefenaminsäure	32,40	29,63	31,02	0,50	15,51	29,70	14,85	853,30	2,93

A: Stoffmenge der Phospholipide (oder der Cholinkopfgruppen), 0.0174mmol.

11. Zusammenfassung

Immobilisierte-Liposomen-Chromatographie (ILC) wurde als eine neue und attraktive chromatographische Methode zur Untersuchung der Wechselwirkung zwischen Arzneimitteln bzw. chemischen Verbindungen und Liposomen eingesetzt, wobei Superdex 200 als Träger für Liposomen verwendet wurde. Für 22 strukturell unterschiedliche Substanzen (4-Methylbenzylalkylamine, β -Blocker, Carbonsäuren und nichtsteroidale Antirheumatika) wurden die Korrelationen von deren spezifischen Retentionsfaktoren- k_s (oder k_{ILC}) aus der ILC mit deren Retentionsfaktoren- k_{IAM} aus der Immobilisierte-Artifizielle-Membran Chromatographie (IAM) und mit deren Verteilungskoeffizienten P_{Okt} bzw. D_{Okt} aus dem 1-Oktanol-Wasser-System untersucht. Es gab lineare Korrelationen sowohl zwischen $\log k_s$ und $\log k_{IAM}$ als auch zwischen $\log k_s$ und $\log P_{Okt}$ bzw. $\log D_{Okt}$ für strukturell verwandte Substanzen. Die beste Korrelation bestand zwischen $\log k_s$ und $\log k_{IAM}$. Darüber hinaus wurden die Korrelationen von den $\log k_s$ -Werten der 4-Methylbenzylalkylamine bzw. der β -Blocker mit deren $\log D_{Lip}$ -Werten untersucht, für β -Blocker gab es eine gute Korrelation zwischen den beiden Parametern, aber für 4-Methylbenzylalkylamine war eine bilineare Beziehung zu sehen.

Durch die k_s -Werte bzw. die $\log k_s$ -Werte können die Wechselwirkungen zwischen einer Substanz und Membranen und die Verteilung der Substanz in der Membran eingeschätzt werden. Weiter kann die Absorption der Substanz in Körper vorhergesagt werden. Wenn sich der $\log k_s$ -Wert im Wertintervall von 0 bis 1 erhöht, nimmt die Absorption eines Arzneimittels in Körper zu und wenn der $\log k_s$ -Wert eines Arzneimittels zwischen 1 und 3 liegt, erreicht die Absorption ein Maximum (Beigi et al. 1995).

Bei der Untersuchung der Wechselwirkung zwischen Borclusterverbindungen und Membran mit ILC wurde entdeckt, dass Borclusterverbindungen mit dem Träger, Superdex 200, stark wechselwirken konnten und dadurch die Wechselwirkung zwischen Clusterverbindungen und Liposomen verfälscht wurde. Von daher wurde sich weiter auf die Wechselwirkungen von Clusterverbindungen mit einigen hydrophilen Gelmaterialien (Superdex 200, Sepharose 4B, Sephadex G-50, Sephadex G-100, Alumina und Silicagel), die als Träger fungieren können, konzentriert. Es wurde weiter belegt, dass Superdex 200 fast alle Borclusterverbindungen verzögern konnte. Halogenierte Clusterverbindungen wechselwirkten mit Sepharose 4B, Sephadex G-50, Sephadex G-100 und Alumina. An Alumina konnten auch der Dodecahydrocluster und seine Derivate verzögert werden. Im Gegensatz dazu

hatte Silicagel die geringsten Wechselwirkungen mit allen Clusterverbindungen. Die thermodynamischen Parameter wurden für einige Clusterverbindungen an Superdex 200 und Sephadex G-100 untersucht, die Enthalpieänderung ΔH° war für beide Gelmaterialien negativ. Ebenfalls negativ war die Entropieänderung ΔS° . Die Enthalpieänderung ΔH° wurde zum großen Teil durch die Entropieänderung ΔS° kompensiert.

Bezogen auf das obige Ergebnis, dass Silicagel alle Borclusterverbindungen fast nicht verzögerte, kam Silicagel als Träger- oder Supportmaterial in Frage. Um eine Membranähnlichkeit mit Silicagel zu schaffen, wurden zuerst EPC-Liposomen kovalent an Silicagel (K-EPC) gebunden. Aus den Retentionen von Borclusterverbindungen war zu schließen, dass hydrophobe Wechselwirkungen eine wichtige Rolle spielten; die Kohlenstoffketten direkt am Cluster, am Schwefel oder Stickstoff konnten die Retentionen erheblich verlängern. Halogenierte Clusterverbindungen konnten gut mit den Kopfgruppen der Liposomen wechselwirken und sich in den Lipiddoppelschichten verteilen, eventuell können sie gut in den Kern des Liposoms diffundieren. Je größer das Halogenatom ist, desto stärker ist die Tendenz. Die Retentionen von Arzneimitteln und chemischen Verbindungen zeigten, dass hydrophobere Substanzen länger verzögert werden konnten. Weiter wurde versucht, unterschiedliche Bruchstücke (und zwar $-(CH_2)_3PO_4(CH_2)_2N(CH_3)_3$, $-PO_4(CH_2)_2N(CH_3)_3$, $-(CH_2)_3O(CH_2)_6PO_4(CH_2)_2N(CH_3)_3$ und $-O(CH_2)_6PO_4(CH_2)_2N(CH_3)_3$ des Phosphatidylcholins kovalent mit Silicagel zu verknüpfen, um die Wechselwirkungen von Borclusterverbindungen mit Membranen besser verstehen zu können. Aus den Messergebnissen mit solchen Säulenmaterialien war klar, dass die elektrostatische Wechselwirkung auch eine Rolle spielt und zur gesamten Wechselwirkungen beigetragen hatte. Was merkwürdig war, die log_k-Werte aus dem $Si-(CH_2)_3PO_4(CH_2)_2N(CH_3)_3$ und dem $Si-(CH_2)_3O(CH_2)_6PO_4(CH_2)_2N(CH_3)_3$ waren kleiner als die aus dem $Si-PO_4(CH_2)_2N(CH_3)_3$. Das widersprach den Ergebnissen aus den Messungen mit dem K-EPC. Vermutlich hatte dies mit der Dichte der addierten Gruppen zu tun. Abgesehen davon war die Stabilität der Gelmaterialien ein Punkt, der noch verbessert werden sollte.

Die Biomimetische Chromatographie und die chromatographische stationäre Phase, welche aus Silicagel und darauf beschichteten Phospholipiden bestand, wurden zur Untersuchung eingesetzt, konnte aber entweder keine plausiblen Ergebnisse geben oder nur beschränkt verwendet werden.

Literatur

Andersson, T., Carlsson, M., Hagel, L., Pernemalm P.-A. and Janson, J.-C. (1985) Agarose-based media for high-resolution gel filtration of biopolymers. *Journal of Chromatography A*, 326: 33-44

Artursson, P. (1990) Epithelial Transport of Drugs in Cell Culture. I: A Model for Studying the Passive Diffusion of Drugs over Intestinal Absorbive (Caco-2) Cells. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 79: 476-482.

Artursson, P., Palm, K., and Luthman, K. (1996) Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Advanced Drug Delivery Reviews* 22 : 67-84

Avdeef, A. (1992) pH-Metric log P_o Part 1. Difference Plots for Determining Ion-Pair Octanol-Water Partition Coefficients of Multiprotic Substances. *Quant. Struct.-Act. Relat.* 11: 510-517

Avdeef, A., Box, K.J., Comer, J.E.A., Hibbert, C., and Tam, K.Y. (1998) pH-Metric log P_{10} . Determination of Liposomal Membrane-Water Partition coefficients of Ionizable Drugs. *Pharmaceutical Research*, 15: 209-215

Awad, D., Damian, L., Winterhalter, M., Karlsson, G., Edwards, K., and Gabel, D. (2009) Interaction of Na₂B₁₂H₁₁SH with dimyristoyl phosphatidylcholine liposomes. *Chemistry and Physics of Lipids* 157: 78-85

Balen, G.P.V., Martinet, C.M., Caron, G., Bouchard, G., Reist, M., Pierre-Alain Carrupt, P.A., Fruttero, R., Gasco, A., and Testa, B. (2004) Liposome/Water Lipophilicity: Methods, Information Content, and Pharmaceutical Applications. *Medicinal Research Reviews*, 24: 299-324

Barth, R.F. (2003) A critical assessment of boron neutron capture therapy: an overview. *Journal of Neuro-Oncology* 62: 1–5

Barth, R.F., Coderre, J.A., Vicente, M.G., and Blue, T.E. (2005) Boron Neutron Capture Therapy of Cancer: Current Status and Future Prospects. *Clin Cancer Res* 11: 3987-4002

Beigi, F. and Lundahl, P. (1999) Immobilized biomembrane chromatography of highly lipophilic Drugs. *Journal of Chromatography A*, 852: 313–317

Beigi, F., Gottschalk, I., Hägglund, C.L., Haneskog, L., Brekkan, E., Zhang, Y., Österberg, T. and Lundahl, P. (1998) Immobilized liposome and biomembrane partitioning chromatography of drugs for prediction of drug transport. *International Journal of Pharmaceutics* 164: 129–137

Beigi, F., Yang, Q., Lundahl, P. (1995) Immobilized-liposome chromatographic analysis of drug partitioning into lipid bilayers. *Journal of Chromatography A*, 704: 315-321

Boija, E. (2006) Partitioning of Drugs and Lignin Precursor Models into Artificial Membranes. *Dissertation in Uni-Uppsala*

Boija, E., Lundquist, A., Pla, J.J.M., Engvall, C., and Lundahl, P. (2004) Effects of ions and detergents in drug partition chromatography on liposomes. *Journal of Chromatography A*, 1030: 273–278

Brady, J.W., Tavagnacco, L., Ehrlich, L., Chen, M., Schnupf, U., Himmel, M.E., M.L. Sabounji, M.L. and Cesaro, A. (2012) Weakly hydrated surfaces and the binding interactions of small biological solutes. *European Biophysics Journal*, 41:369-377.

Brechner, E., Dinkelacker, B. und Dreesmann, D., Kompaktlexikon der Biologie auf CD-ROM.

Brekkan, E., Lu, L., and Lundahl, P. (1995) Properties of immobilized-liposome- chromatographic supports for interaction analysis. *Journal of Chromatography A*, 711: 33-42

Brekkan, E., Lundqvist, A., and Lundahl, P. (1996) Immobilized Membrane Vesicle or Proteoliposome Affinity Chromatography. Frontal Analysis of Interactions of Cytochalasin B and D-Glucose with the Human Red Cell Glucose Transporter. *Biochemistry* 35: 12141-12145

Camenisch, G., Folkers, G., van deWaterbeemd, H., (1996) Review of

theoretical passive absorption models: historical background, recent developments and limitations. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 71: 309–327.

Caron, G., Gaillard, P., Carrupt, P.A., and Testa, B. (1997) Lipophilicity Behavior of Model and Medicinal Compounds Containing a Sulfide, Sulfoxide, or Sulfone Moiety. *Helvetica Chimica Acta*, 80: 449-462

Chan, E.C.Y., Tan, W.L., Ho, P.C., Fang, L.J. (2005) Modeling Caco-2 permeability of drugs using immobilized artificial membrane chromatography and physicochemical descriptors. *Journal of Chromatography A* 1072: 159–168

Clarke, F.H. (1984) Ionization Constants by Curve Fitting: Application to The Determination of Partition Coefficients. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 73: 226-230

Clarke, F.H., and Cahoon, N.M. (1987) Ionization Constants by Curve Fitting: Determination of Partition and Distribution Coefficients of Acids and Bases and Their Ions. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 76: 611-620

Cohen, D.E., and Leonard, M.R. (1995) Immobilized artificial membrane chromatography: a rapid and accurate HPLC method for predicting bile salt-membrane interactions. *Journal of Lipid Research* 36: 2451-2460

Collins, K.D. (1995) Sticky ions in biological systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92: 5553-5557.

Conradi, R.A., Burton, P.S., Borchardt, R.T., 1996. Physico-chemical and biological factors that influence a drug's cellular permeability by passive diffusion. In: Pliska, V., Testa, B., van de Waterbeemd, H. (Eds.), *Lipophilicity in Drug Action and Toxicology*. VCH Publishers, Germany, pp. 233–252.

Domínguez, J.A.G. and Díez-Masa, J.C. (2001) Retention Parameters in Chromatography Part A. Hold-Up Volume Concept in Column Chromatography. *Pure and Applied Chemistry*, 73: 969-992.

Durrani, A.A., Hayward, J.K., and Chapman, D., (1986) Biomembranes as models for polymer surfaces II. The syntheses of reactive species for

covalent coupling of phosphorylcholine to polymer surfaces. *Biomaterials* 7: 121-125

Frank, H. Clarke, F.H., and Cahoon, N.M. (1996) Partition Coefficients by Curve Fitting: The Use of Two Different Octanol Volumes in a Dual-Phase Potentiometric Titration. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 85: 178-183

Fruttero, R., Caron, G., Fornatto, D., Boschi, D., Ermondi, G., Gasco, A., Carrupt, P.A., and Testa, B. (1998) Mechanisms of Liposomes/Water Partitioning of (p-Methylbenzyl)alkylamines. *Pharmaceutical Research*, 15: 1407-1413

Gabel, D., Awad, D., Schaffran, T., Radovan, D., Daraban, D., Damian, L., Winterhalter, M., Karlsson, G., and Edwards, K. (2007) The Anionic Boron Cluster $(B_{12}H_{11}SH)^{2-}$ as a means to trigger release of liposome contents. *ChemMedChem* 2: 51–53

Gabel, D. (1997) Bor-Neutroneneinfangtherapie von Tumor. *Chemie in unserer Zeit*, 31: 235-240

Geilen, C.C., Samson, A., Wieder, Th., Wild, H., and Reutter, W. (1992) Synthesis of Hexadecylphospho[methyl- ^{14}C]-choline. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, XXXI: 1071-1076

Grüner, B., Plzák, Z. and Vinš, I. (1991) Chromatographic behaviour of the closo-[$B_{12}H_{12}$] $^{2-}$ derivatives on hydroxyethylmethacrylate gels. *Journal of Chromatography A*, 588 : 201-210

Gulyaeva, N., Zaslavsky, A., Lechner, P., Chlenov, M., Chait, A., and Zaslavsky, B. (2002) Relative hydrophobicity and lipophilicity of β -Blockers and related compounds as measured by aqueous two-phase partitioning, octanol–buffer partitioning, and HPLC. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 17: 81–93

Hernando, V., Rieutord, A., Pansu, R., Brion, F., Prognon, P. (2005) Immobilised artificial membrane chromatography coupled with molecular probing Mimetic system for studying lipid–calcium interactions in nutritional mixtures. *Journal of Chromatography A* 1064: 75–84

Hitzel, L., Watt, A.P., and Locker, K.L. (2000) An Increased Throughput Method for the Determination of Partition Coefficients. *Pharmaceutical Research*, 17: 1389-1395

Holmberg, L., Lindberg, B. and Lindqvist, B. (1995) The reaction between epichlorohydrin and polysaccharides : structural elements in a cross-linked dextran, Sephadex® G-25. *Carbohydrate Research*, 272: 203-211.

Hu, W., Haddad, P.R., Hasebe, K., Mori, M., Tanaka, K., Ohno, M., and Kamo, N. (2002) Use of a Biomimetic Chromatographic Stationary Phase for Study of the Interactions Occurring between Inorganic Anions and Phosphatidylcholine Membranes. *Biophysical Journal* 83:335-3356

Johansson, E., Engvall, E., Arfvidsson, M., Lundahl, P. and Edwards, K. (2005) Development and initial evaluation of PEG-stabilized bilayer disks as novel model membranes. *Biophysical Chemistry* 113:183-192

Johansson, E., Lundquist, A., Zuo, S. and Edwards, K. (2007) D Nanosized bilayer disks: Attractive model membranes for drug partition studies. *Biochimica et Biophysica Acta* 1768: 1518-1525

Kaliszan, R., Nasal, A., Bucinski, A. (1994) Chromatographic hydrophobicity parameter determined on an immobilized artificial membrane column: relationships to standard measures of hydrophobicity and bioactivity. *European Journal of Medicinal Chemistry* 29: 163-170

Karki, K., Gabel, D. and Roccatano, D. (2012) Structure and Dynamics of Dodecaborate Clusters in Water. *Inorganic Chemistry* 51: 4894-4896

Kaufman, J.J., Semo, N.M., and Koski, W.S. (1975) Microelectrometric Titration Measurement of the pKa's and Partition and Drug Distribution Coefficients of Narcotics and Narcotic Antagonists and Their pH and Temperature Dependence. *Journal of Medicinal Chemistry* 18: 647-655

Khaleque, M.A., Okumura, Y., and Mitani, M. (2006) Liposome Immobilization on Cross-linked Polymer Gel by *In Situ* Formation of Cleavable Covalent Bonds. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* 21:539-555

Khaleque, M.A., Okumura, Y., Yabushita, S., and Mitani, M. (2004) Detachable immobilization of liposomes on polymer gel particles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 37: 35–42

Koryakin, S.N. (2006) Molecular-Biological Problems of Drug Design and Mechanism of Drug Action: Compounds for Neutron Capture Therapy and Their Distribution in Tumors and Surrounding Tissues of Animals (A Review). *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 40: 583-587

Kotecha, J., Shah, S., Rathod, I. and Subbaiah, G. (2007) Relationship between immobilized artificial membrane chromatographic retention and human oral absorption of structurally diverse drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 333: 127-135.

Kotecha, J., Shah, S., Rathod, I., Subbaiah, G. (2007) Relationship between immobilized artificial membrane chromatographic retention and human oral absorption of structurally diverse drugs. *International Journal of Pharmaceutics* 333: 127–135

Leo, A., Hansch, C., and Elkins, D. (1971) Partition Coefficients and Their Uses. *Chemical Reviews*, 71: 525-616

Leo, A.J. (1993) Calculating logP_{Oct} from Structures. *Chemical Reviews*, 93: 1281-1306

Li, J., Sun, J., Cui, S., He, Z. (2006) Quantitative structure-retention relationship studies using immobilized artificial membrane chromatography I: Amended linear solvation energy relationships with the introduction of a molecular electronic factor. *Journal of Chromatography A* 1132: 174–182

Li, J., Sun, J., He, Z. (2007) Quantitative structure–retention relationship studies with immobilized artificial membrane chromatography II: Partial least squares regression. *Journal of Chromatography A* 1140: 174–179

Liu, X., Fan, P., Chen, M., Hefesha, H., Gerhard K. E. Scriba, G.K.E., Gabel, D. and Fahr, A. (2010) Drug -Membrane Interaction on Immobilized Liposome Chromatography Compared to Immobilized Artificial Membrane (IAM), Liposome/Water, and Octan-1-ol/Water Systems. *Helvetica Chimica Acta* 93:

203-211

Liu,X., Hefesha,H., Scriba,G., and Fahr,A. (2008) Retention Behavior of Neutral and Positively and Negatively Charged Solutes on an Immobilized-Artificial-Membrane (IAM)Stationary Phase. *Helvetica Chimica Acta* 91: 1505-1512

Liu, X.Y., Nakamura, C.,Yang, Q., Kamo, N. and Miyake, J. (2002) Immobilized liposome chromatography to study drug–membrane interactions Correlation with drug absorption in humans. *Journal of Chromatography A*, 961: 113–118

Liu, X.Y., Yang, Q., Kamo, N. and Miyake, J. (2001) Effect of liposome type and membrane fluidity on drug–membrane partitioning analyzed by immobilized liposome chromatography. *Journal of Chromatography A*, 913: 123–131

Liu, X.Y., Yang, Y., Hara, M., Nakamura, C. and Miyake, J. (2001) A novel chromatographic solid support with immobilized unilamellar liposomes for model analysis of solute–membrane interaction: comparison with analysis using immobilized artificial membranes and free liposomal membranes. *Materials Science and Engineering* C17:119–126

Lu, L., Brekkan, E., Haneskog, L., Yang, Q. and Lundahl, P. (1993) Effects of pH on the activity of the human red cell glucose transporter Glut 1: transport retention chromatography of o-glucose and L-glucose on immobilized Glut 1 Liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1150: 135-146

Lundahl, P. and Beigi, F. (1997) Immobilized liposome chromatography of drugs for model analysis of drug membrane Interactions. *Advanced Drug Delivery Reviews* 23: 221-227

Lundahl, P., and Yang, Q. (1991) Liposome chromatography: liposomes immobilized in gel beads as a stationary phase for aqueous column chromatography. *Journal of Chromatography*, 544: 283-304

Lundqvist, A., Ocklind, G., Haneskog, L., and Lundahl, P. (1998) Freeze–thaw immobilization of liposomes in chromatographic gel beads: evaluation by confocal microscopy and effects of freezing rate. *Journal of Molecular*

Recognition, 11: 52–57

Maisano, F., Belew, M., and Porath, J. (1985) Synthesis of new hydrophobic adsorbents based on homologous series of uncharged alkyl sulphide agarose derivatives. *Journal of Chromatography*, 321: 305-317

Mao, X., Kong, K., Luo, Q., Li, X., and Zou, H. (2002) Screening and analysis of permeable compounds in *Radix Angelica Sinensis* with immobilized liposome chromatography. *Journal of Chromatography B*, 779: 331–339

Mao, X., Kong, L., Li, X., Guo, B., and Zou, H. (2003) Unilamellar liposomes covalently coupled on silica gel or liquid chromatography. *Anal Bioanal Chem* 375: 550–555

Markovich, R.J., Stevens, J.M., and Pidgeon, C. (1989) Fourier Transform Infrared Assay of Membrane Lipids Immobilized to Silica: Leaching and Stability of Immobilized Artificial Membrane-Bonded Phases. *Analytical Biochemistry* 182: 237-244

Nasal, A., Sznitowska, M., Bucifiski, A., Kaliszan, R. (1995) Hydrophobicity parameter from high-performance liquid chromatography on an immobilized artificial membrane column and its relationship to bioactivity. *Journal of Chromatography A* 692: 83-89

Ohno, M., Ikehara, T., Nara, T., Kamo, N. and Miyauchi, S. (2004) The elution profile of immobilized liposome chromatography: determination of association and dissociation rate constants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1665: 167–176

Ong, S., Liu, H., Pidgeon, C. (1996) Immobilized-artificial-membrane chromatography: measurements of membrane partition coefficient and predicting drug membrane permeability. *Journal of Chromatography A*, 728: 113-128

Ong, S., Liu, H., Qiu, X., Bhat, G., and Pidgeon, C. (1995) Membrane Partition Coefficients Chromatographically Measured Using Immobilized Artificial Membrane Surfaces. *Anal. Chem.* 67: 755-762

Österberg, T., Svensson, M. and Lundahl, P. (2001) Chromatographic retention of drug molecules on immobilised liposomes prepared from egg phospholipids and from chemically pure phospholipids. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 12:427–439

Palm, K., Stenberg, P., Luthman, K., and Artursson, P. (1997) Polar Molecular Surface Properties Predict the Intestinal Absorption of Drugs in Humans. *Pharmaceutical Research*, 14: 568-571

Palm, K., Stenberg, P., Ungell, A.L., Strandlund, G., and Artursson, P. (1996) Correlation of Drug Absorption with Molecular Surface Properties. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 85 32-39

Pehourcq, F., Jarry, C., Bannwarth, B. (2003) Potential of immobilized artificial membrane chromatography for lipophilicity determination of arylpropionic acid nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 33: 137-144

Pidgeon, C. (1990) Solid phase membrane mimetics: Immobilized artificial membranes. *Enzyme Microb. Technol.*, 12: 149-150

Pidgeon, C., and Venkataram, U.V. (1989) Immobilized Artificial Membrane Chromatography: Supports Composed of Membrane Lipids. *Analytical Biochemistry* 176: 36-47

Pidgeon, C., Ong, S., Liu, H., Qiu, X., Pidgeon, M., Dantzig, A.H., Munroe, J., Hornback, W.J., Kashner, J.S., Glunz, L., and Szczerba, T. (1995) IAM Chromatography: An *in Vitro* Screen for Predicting Drug Membrane Permeability. *J. Med. Chem.* 38: 590-594

Pidgeon, C., Stevens, J., Otto, S., Jefcoate, C., and Marcus, C. (1991) Immobilized Artificial Membrane Chromatography: Rapid Purification of Functional Membrane Proteins. *Analytical Biochemistry* 194: 163-173

Sandberg, M., Lundahl, P., Greijer, E., and Belew, M. (1987) Immobilization of phospholipid vesicles on alkyl derivatives of agarose gel beads. *Biochimica et Biophysica Acta* 924: 185-192

Sessa, G. and Weissman G. (1968) Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes. *Journal of Lipid Research*, 9: 310-318. LIPO1

Smith, R.N., Hansch, C., and Ames, M.M. (1975) Selection of a Reference Partitioning System for Drug Design Work. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 64: 599-606

Soloway, A.H., Tjarks, W., Barnum, B.A., Rong, F.-G., Barth, R.F., Codogni, I.M. and Wilson, J.G. (1998) The Chemistry of Neutron Capture Therapy. *Chemical Reviews*, 98 : 1515-1562.

Soloway, A.H., Tjarks, W., Barnum, B.A., Rong, F.-G., Barth, R.F., Codogni, I.M. and Wilson, J.G. (1998) The Chemistry of Neutron Capture Therapy. *Chemical Reviews*, 98 : 1515-1562.

Taillardat-Bertschinger, A., Galland, A., Carrupt, P.A., Testa, B. (2002a) Immobilized artificial membrane liquid chromatography: proposed guidelines for technical optimization of retention measurements. *Journal of Chromatography A* 953: 39–53

Taillardat-Bertschinger, A., Martinet, C.A.M., Carrupt, P.A., Reist, M., Caron, G., Fruttero, R. and Testa, B. (2002b) Molecular Factors Influencing Retention on Immobilized Artificial Membranes (IAM) Compared to Partitioning in Liposomes and *n*-Octanol. *Pharmaceutical Research* 19: 729-737

Tan, T., Su, Z.-G., Gu, M., Xu, J. and Janson, J.-C. (2010) Cross-linked agarose for separation of low molecular weight natural products in hydrophilic interaction liquid chromatography. *Biotechnology Journal*. 5: 505-510.

Ujimoto, K. and Kurihara, H. (1981a) Mechanism of Separation of Aliphatic Alcohols in Aqueous Dextran Gel System. *Journal of Chromatography A* 208 : 183-200

Ujimoto, K., Suzuki, K. and Kurihara, H. (1981b) Gel Chromatographic Behaviour of Tetraalkylammonium Ions on Sephadex G-10. *Journal of Chromatography A*, 210: 1-10

van de Waterbeemd, H. and Testa, B., 1987. The parameterization of lipophilicity and other structural properties in drug design. In: Testa, B. (Ed.),

Advances in Drug Research, vol. 16. Academic Press, London, pp. 87–227.

Vrakas, D., Giaginis, C., Tsantili-Kakoulidou, A. (2008) Electrostatic interactions and ionization effect in immobilized artificial membrane retention A comparative study with octanol–water partitioning. *Journal of Chromatography A* 1187: 67–78

Vrakas, D., Giaginis, C., Tsantili-Kakoulidou, A. (2006) Different retention behavior of structurally diverse basic and neutral drugs in immobilized artificial membrane and reversed-phase high performance liquid chromatography: Comparison with octanol–water partitioning. *Journal of Chromatography A* 1116: 158–164

Wallsten, M., Yang, Q., and Lundahl, P. (1989) Entrapment of lipid vesicles and membrane protein-lipid vesicles in gel bead pores. *Biochimica et Biophysica Acta*, 982: 47-52

Ward, R.S., Davies, J., Hodges, G., Roberts, D.W. (2003) Applications of immobilised artificial membrane chromatography to quaternary alkylammonium sulfobetaines and comparison of chromatographic methods for estimating the octanol–water partition coefficient. *Journal of Chromatography A* 1007: 67–75

Yang, C.Y., Cai, S.J., Liu, H., Pidgeon, C. (1996) Immobilized Artificial Membranes - screens for drug membrane interactions. *Advanced Drug Delivery Reviews* 23: 229-256

Yang, Q., and Lundahl P. (1994) Steric Immobilization of Liposomes in Chromatographic Gel Beads and Incorporation of integral Membrane Proteins into their Lipid Bilayers. *Analytical Biochemistry* 218: 210-221

Yang, Q., and Lundahl P. (1995) Immobilized Proteoliposome Affinity Chromatography for Quantitative Analysis of Specific Interactions between Solutes and Membrane Proteins. Interaction of Cytochalasin B and D-Glucose with the Glucose Transporter Glut 1. *Biochemistry* 34: 7289-7294

Yang, Q., Lundqvist, A., and Lundahl, P. (1990a) Lipid-vesicle-surface chromatography. *Journal of Chromatography*, 506: 379-389

Yang, Q., and Lundahl, P. (1990b) Binding of lysozyme on the surface of entrapped phosphatidylserine- phosphatidylcholine vesicles and an example of high-performance lipid vesicle surface chromatography. *Journal of Chromatography*, 512: 377-386

Yang, Q., Liu, X.Y., Shu-ichi Ajiki, S., Hara, M., Lundahl, P., and Miyake, J. (1998) Avidin-biotin immobilization of unilamellar liposomes in gel beads for chromatographic analysis of drug-membrane partitioning. *Journal of Chromatography B*, 707: 131-141

Yang, Q., Liu, X.Y., Yoshimoto, M., Kuboi, R. and Miyake, J. (1999a) Covalent Immobilization of Unilamellar Liposomes in Gel Beads for Chromatography. *Analytical Biochemistry* 268: 354-362

Yang, Q., Liu, X.Y., Umetani, K., Kamo, N., and Miyake, J. (1999b) Partitioning of triphenylalkylphosphonium homologues in gel bead-immobilized liposomes: chromatographic measurement of their membrane partition coefficients. *Biochimica et Biophysica Acta* 1417: 122-130

Yang, Q., Wallsten, M., and Lundahl P. (1988) Immobilization of phospholipid vesicles and protein-lipid vesicles containing red cell membrane proteins on octyl derivatives of large-pore gels. *Biochimica et Biophysica Acta* 938: 243-256

Yano, Y. and Janado, M. (1980) Hydrophobic Interaction Chromatography of Aliphatic Alcohols on Unsubstituted Ephasex Gels with High Dextran Concentrations. *Journal of Chromatography A*, 200: 125-136

Yen, T.E., Agatonovic-Kustrin, S., Evans, A.M., Nation, R.L., Ryand, J. (2005) Prediction of drug absorption based on immobilized artificial membrane (IAM) chromatography separation and calculated molecular descriptors. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 38: 472-478

Zhang, Y., Aimoto, S., Liu, L., Yang, Q. and Lundahl P. (1995) Immobilized Liposome Chromatography for Analysis of Interactions between Lipid Bilayers and Peptides. *Analytical Biochemistry* 229: 291-298

Zhang, Y., Zeng, C.M., Li, Y.M., Hjerten, S., and Lundahl, P. (1996) Immobilized liposome chromatography for drugs on capillary continuous beds for model analysis of drug-membrane interactions. *Journal of Chromatography A*, 749:13-18

Bücher

Liposomes: a practical approach (second Edition) Edited by Torchilin, V. and Volkmar, W. oxford university press 2003

Gel Filtration: Principles and Methodes. (8th Edition) Amersham Pharmacia Biotech

Introduction to Modern Liquid Chromatography, Third Edition. Edited by Snyder, L.R., Kirkland, J.J. and Dolan, J. W., 2010, A John Wiley & Sons, Inc., Publication, p.25-27.

Journal of Chromatography Library, Bywater, R.P., and Marsden, N.V.B. in E. Heftmann (Editor), 1983, Elsevier, p. A257.

Lehninger Principles of Biochemistry, fourth Edition. Edited by Nelson, D.L. and Cox, M.M. W.H. Freeman and Company. 343-415

Stryer Biochemie, 6. Auflage. Edited by Berg, J.M., Tymoczko, J.L. and Stryer, L. Spektrum Akademischer Verlag. 365-392

Liposomes as Drug Carriers, Edited by Schmidt, K.H. Georg Thieme Verlag. 1986. P.1-25 and 48-60

Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie, Aktualisierte, 9. Auflage. Edited by Meyer, V.R., 2004, Wiley-VCH Verlag. 118-120

Abkürzungsverzeichnis

1PC-Gel	Silicagel- $(\text{CH}_2)_3\text{PO}_4(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_3)_3$
2PC-Gel	Silicagel- $\text{PO}_4(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_3)_3$
3PC-Gel	Silicagel- $(\text{CH}_2)_3\text{O}(\text{CH}_2)_6\text{PO}_4(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_3)_3$
4PC-Gel	Silicagel- $\text{O}(\text{CH}_2)_6\text{PO}_4(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_3)_3$
A	Stoffmenge der Kopfgruppe des Phosphatidylcholins in einer chromatographischen Säule
BNCT	Bor-Neutroneneinfangtherapie
BNEt_2Bz	$\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{NEt}_2\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5^-$
BNEt_3	$\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{NEt}_3^-$
BNH_2Bz	$\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{NH}_2\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5^-$
BNH_3	$\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{NH}_3^-$
BNMe_3	$\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{NMe}_3^-$
BNPr_3	$\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{NPr}_3^-$
BSH	$\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}^{2-}$
C	Konzentration
CTS	(3-Chloropropyl)trimethoxysilan
DD	Drug Discovery
D_{Lip}	Verteilungskoeffizient aus Liposomen-Wasser-System
D_{Okt}	Verteilungskoeffizient aus 1-Oktanol-Wasser-System bezogen auf unterschiedliche Spezies in beiden Phasen
DMPC	1, 2-dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DPPC	1, 2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphatidylcholin
EPC	Egg Phosphatidylcholin
ESI	Elektrospray Ionisation
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IAM	Immobilisierte-Artifizielle-Membran Chromatographie
ILC	Immobilisierte-Liposomen-Chromatographie
K-EPC-Gel	Silicagel mit kovalent gebundenen EPC-Liposomen
$k_s (k_{\text{ILC}})$	spezifische Kapazitätsfaktor aus ILC $k_s = (V_R - V_0)/A$
k_{IAM}	Kapazitätsfaktor aus IAM $k_{\text{IAM}} = (V_R - V_0)/V_0$
V_R	Retentionsvolumen einer Substanz

t_R	Retentionszeit einer Substanz
t_0	Totzeit einer ILC- oder IAM-Säule
V_0	Totzvolumen einer ILC- oder IAM-Säule
k	Retentionsfaktor(basiert auf der Retention einer Boron -clusterverbindung an hydrophilen Säulenmaterialien) $k = (V_R - V_M)/V_M$
V_M	Hold-up-Volumen
K	Gleichgewichtskonstante (Equilibrium constant: basiert auf der Wechselwirkung einer Borclusterverbindung mit hydrophilen Säulenmaterialien). $K = k \cdot \Phi$
Φ	Phasenverhältnis: das Volumenverhältnis zwischen mobiler Phase und stationärer Phase
MS	Massenspektrometrie
NSAR	nichtsteroidale Antirheumatika
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphoethanolamin
PG	Phosphoglycerol
PI	Phosphoinositol
P_{Okt}	Verteilungskoeffizient aus 1-Oktanol-Wasser-System
PS	Phosphoserin
RT	Raumtemperatur
UV/VIS	Ultraviolet-Visible

Erklärung

Hermit erkläre ich, dass ich

- die beigefügte Dissertation selbstständig verfasst
- keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe und
- alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.